



**Rosa Maria Santos
Pais da Costa Dias**

**Manuais de Teste de Fármacos: Tradução e Análise
Linguística**



**Rosa Maria Santos
Pais da Costa Dias**

**Manuais de Teste de Fármacos: Tradução e Análise
Linguística**

Relatório de projecto apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Mestrado em Tradução Especializada, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Teresa Costa Gomes Roberto, Professora Auxiliar do Departamento de Línguas e Culturas da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria Teresa Murcho Alegre
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Bruno Miguel Alves Fernandes do Gago
Assistente Convidado da Universidade de Aveiro (arguente)

Prof. Doutora Maria Teresa Costa Gomes Roberto
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro (Orientadora)

Agradecimentos

Gostaria de aproveitar este espaço para expressar os meus mais sinceros e calorosos agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível:

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Maria Teresa Roberto, que contribuiu largamente para a motivação respeitante à escolha desta linha de formação, numa primeira fase, e ainda pelo abraçar deste projecto. Pela competência e segurança que transmite, pelo empenho e paixão que deposita no seu trabalho, e pela orientação e inspiração constantes durante todo o Mestrado.

Também à Mestre Cláudia Pinto Ferreira pela disponibilidade e pela paciência demonstradas perante todas as minhas dúvidas, questões e pedidos de esclarecimento ao longo de todo o processo de formação que, embora não directamente, me capacitaram para a consecução deste projecto.

Aos Professores Doutor Luís Almeida, Doutor Bruno Gago e Doutor Samuel Silvestre pela validação dos termos deste trabalho, e pela prontidão demonstrada em ajudar a solucionar questões tradutológicas relacionadas com a terminologia técnica. Ao Doutor Bruno Gago dirijo um especial agradecimento pela disponibilização do seu tempo e atenção para debater aspectos de cariz linguístico, contribuindo assim para a obtenção de um texto adaptado ao público-alvo.

A todos os colegas cujos percursos se cruzaram com o meu, obrigado pelo apoio, amizade, partilha, crescimento, alegria, e por tornarem a minha segunda passagem pelo Departamento de Línguas e Culturas muito mais do que o esperado, pela forma como me acolheram e me fizeram, fazem e farão sorrir.

Em especial à Inês, companheira de guerra, por tornar a realização deste projecto muito mais agradável e proveitosa do que já seria, e por se inserir no grupo referido anteriormente.

Um agradecimento especial é merecido do meu marido e filhos, pela força e coragem que me permitiram adquirir, e pelo apoio incondicional e dedicação que sempre demonstraram, apesar de todo o tempo e atenção que lhes roubou.

Também aos meus pais e irmãs agradeço o carinho e incentivo em mais esta etapa, os quais têm sido uma constante ao longo da minha vida.

Em geral, a todos os que acreditaram em mim e me apoiaram e acompanharam durante esta jornada, expresso o meu respeito e profundo agradecimento!

palavras-chave

Fármacos, Cromatografia em Camada Fina, Minilab, medicamentos falsificados, desambiguação, aspectos linguísticos, estrutura frásica

resumo

O texto de partida que esteve na base do desenvolvimento deste projecto foi o *Manual Accompanying The GPHF - Minilab®, Volume II, Thin Layer Chromatographic Tests*, editado pela Global Pharma Health Fund (GPHF), uma instituição de beneficência iniciada e patrocinada pela Merck Darmstadt – Alemanha. O projecto insere-se no Mestrado de Tradução Especializada, no âmbito específico da Saúde e Ciências da Vida.

Estamos na presença de um manual que contém os procedimentos a efectuar para testar a qualidade de vários fármacos através de Cromatografia em Camada Fina, usando, para tal, o material constante do Minilab. Destina-se a ser usado, sobretudo, em países de África, em que a disseminação de medicamentos falsificados assume proporções escandalosas. Devido ao desconhecimento do grau de formação dos utilizadores do texto, possivelmente voluntários, tornou-se imperioso que se procurasse torná-lo o mais claro possível, utilizando-se, sempre que necessário, estratégias de desambiguação aquando da sua translação para a língua de chegada, o português.

Este relatório visa explicar a metodologia que norteou todo o processo de tratamento e tradução do texto e apresentar uma reflexão acerca dos problemas e situações tradutológicas que foram surgindo ao longo desse processo, fundamentando a sua resolução e expondo exemplos práticos.

Estas questões tradutológicas centraram-se nos aspectos linguísticos e, concretamente, nas alterações ao nível da estrutura frásica que se consideraram pertinentes para a transmissão eficaz da mensagem. As opções tomadas são apresentadas segundo razões de cariz pragmático, estilístico e sintáctico.

keywords

Drugs, Thin Layer Chromatography, Minilab, counterfeit medicines, disambiguation, linguistic aspects, sentence structure.

abstract

The source text on which this translation project was developed was the *Manual Accompanying The GPHF - Minilab®, Volume II, Thin Layer Chromatographic Tests*, edited by The Global Pharma Health Fund (GPHF), a charitable institution initiated and maintained by Merck Darmstadt – Germany. This project is a requirement for the Masters in Specialized Translation in the specific field of Health and Life Sciences.

We are in the presence of a user manual that contains the procedures to be observed when testing the quality of several drugs through Thin Layer Chromatography testing, using the contents of the Minilab. It is meant to be used mostly in African countries, where the proliferation of counterfeit medicines is reaching scandalous proportions. Due to the fact that the level of formal education of its users, who are probably volunteers, is unknown to us, it became an imperative to make an effort to render the text as clear as possible. With that purpose in mind, disambiguation strategies were used whenever it was considered appropriate during the process of translating the text into the target language – Portuguese.

The present report aims at expounding the methodology that guided the entire process of treatment and translation of the text and presenting a reflection on the translatorial problems and special situations that arose along the process. Their resolution is supported by theoretical research and illustrated with examples taken from the source and target texts.

These translatorial problems are centered on the linguistic aspects and, more exactly, on the changes occurring at the level of the sentence structure that were considered of substantial importance for the efficient conveyance of the message. The options that were taken are presented according to three types of reasons: pragmatic, stylistic and syntactic.

Conteúdos

1.Introdução	1
2.Enquadramento do texto seleccionado no âmbito do mestrado em tradução especializada na área da saúde.....	3
3.Definição da metodologia de trabalho com base no modelo tradutivo de Gouadec.....	7
4.Fase de Pós-tradução	11
4.1 Caracterização do Texto de Partida	11
4.2 Definição da Metodologia Tradutiva com base na Teoria Skopos.....	16
5.Fase de Tradução	18
5.1 Pré-transferência	18
5.1.1 Recursos e Meios de Apoio à Tradução	18
5.1.2 Materiais de referência e tipicação de fontes.....	20
5.2 Fase de Transferência.....	22
5.2.1 Problemática de questões tradutológicas a nível pragmático	23
5.2.2 Problemática de questões tradutológicas a nível estilístico	27
5.2.3 Problemática de questões tradutológicas a nível sintáctico	35
5.3 Fase de Pós-transferência.....	47
5.3.1 Revisão Linguística.....	47
5.3.2 Revisão Científica.....	50
6.Fase de Pós-tradução	53
7.Notas Conclusivas.....	55
8.Bibliografia.....	59
9.Webgrafia	61
10.Glossários, enciclopédias, gramáticas, conversores, legislação	63
Anexo	67

Índice de Figuras

Figura 1: GPHF - MiniLab.....	11
-------------------------------	----

1.Introdução

Este trabalho apresenta-se como uma tentativa, esperemos que bem conseguida, de explanar todo o processo que esteve na origem e consecução do projecto em que trabalhámos, bem como as reflexões, conhecimentos e conclusões que nos suscitou.

Parte-se da fase de contacto com o texto original, que nos chegou na sua forma impressa, contextualizando-se os motivos e a forma como surgiu.

Abordaremos, de seguida, o método que orientou o processo de tradução, baseado nos preceitos de Daniel Gouadec.

A problematização das questões tradutológicas com que nos deparámos teve como linha orientadora a análise contrastiva das duas línguas com que trabalhámos – o inglês e o português, procurando-se apresentar as alterações efectuadas ao transpor a mensagem de uma língua para a outra e reflectir acerca das razões dessas alterações, dedicando especial atenção aos seus mecanismos sintácticos e às diferenças na forma como a mesma mensagem é veiculada nestas duas línguas.

2. Enquadramento do texto seleccionado no âmbito do mestrado em tradução especializada na área da saúde

O processo de selecção do tema a tratar ou da obra a traduzir nesta última etapa do mestrado em tradução especializada na área da saúde culminou de uma forma algo diferente. Podemos dizer até que não fomos nós que caminhamos na direcção deste projecto, foi ele que veio até nós. Com efeito, no final do ano lectivo 2009-2010, a Doutora Maria Teresa Roberto propôs-nos, à minha colega Inês Grilo e a mim, que traduzíssemos parte de dois manuais disponibilizados pelos laboratórios Merck, na Alemanha, para testar a fiabilidade de fármacos.

Foram vários os motivos que nos levaram a abraçar esta tarefa com entusiasmo, sendo o mais determinante o facto de sabermos que estes manuais seriam efectivamente usados no terreno, em países africanos, e que o nosso trabalho constituiria uma maneira de contribuir, de alguma forma, para melhorar as condições de vida de algumas pessoas e até as condições de trabalho de outras, que tentam proteger a saúde das primeiras.

A orientadora foi a grande impulsionadora deste projecto. Começou por nos comunicar que havia sido abordada pela responsável das relações internacionais dos laboratórios Merck, a Doutora Kerstin Wallrapp, que, a pedido da Doutora Pöhlmann, lhe propusera atribuir a tradução, com alguma urgência, de trinta e cinco páginas dos referidos manuais, a dois estudantes seus. Auscultou-nos, então, quanto ao nosso interesse nesta tarefa e incentivou-nos a aceitar o desafio, sublinhando as vantagens que este nos traria. Estas vantagens passavam pela possibilidade de colaborar com um laboratório internacional, adquirir experiência na área específica do nosso mestrado e, simultaneamente, produzir um documento útil, que seria apresentado pela Doutora Pöhlmann e imediatamente usado na Guiné-Bissau para suplantar as dificuldades linguísticas que os manuais originais apresentavam aos técnicos no terreno. Propôs-nos ainda a Doutora Teresa

Roberto que efectuássemos a tradução das restantes páginas dos manuais no ano lectivo seguinte, como projecto final do mestrado.

Importa salientar o valor incalculável destes manuais, que não pode ser medido no sentido material, mas sim ao nível do seu conteúdo, da sua função, pois contribuem para salvar numerosas vidas. Num contexto de crescente propagação do comércio de medicamentos falsificados, principalmente nos países em vias de desenvolvimento, em que as instalações de saúde são escassas e precárias e a comercialização de medicamentos é levada a cabo em locais tão diversos como mercados e estabelecimentos comerciais de todo o tipo, por pessoas sem qualificações e/ou sem escrúpulos, estes manuais funcionam como um instrumento valiosíssimo para os voluntários que disponibilizam o seu tempo e recursos, nomeadamente os seus conhecimentos, na ajuda aos doentes destes países e se deparam com mais este entrave à sua acção.

Segundo dados apresentados pela *Science and Development Network*, cerca de 30% dos medicamentos que circulam em algumas partes de África, da Ásia e da América Latina são falsificados, constituindo uma ameaça para a saúde pública. A maioria dos doentes não consegue perceber se os medicamentos são genuínos ou falsificados, se agravam a sua situação ou se contribuem para a sua cura.

Os ministérios da saúde e diversas organizações tentam combater a circulação e o uso destes perigosos medicamentos através da implementação de programas educativos, acções ao nível da regulamentação e acções de fiscalização do controlo da qualidade dos produtos comercializados.

Os manuais traduzidos no decorrer deste projecto foram editados pela Global Pharma Health Fund (GPHF), uma instituição de beneficência iniciada e patrocinada pela Merck Darmstadt – Alemanha.

Na fase inicial, foram analisadas e traduzidas várias páginas de dois manuais: o Volume I - Testes Colorimétricos e o Volume II – Cromatografia em Camada Fina. Posteriormente, recebemos também o suplemento de 2010 ao Volume II. O conjunto dos três manuais totaliza trezentas e cinquenta e sete

páginas, em que são indicados os procedimentos de teste de trinta e duas substâncias activas, no primeiro manual, quarenta e três no segundo e nove no suplemento. Algumas substâncias constam dos dois volumes, por estes se referirem a tipos de testes diferentes.

Dado que os manuais foram disponibilizados na sua forma impressa, foi necessário digitalizar todas as suas páginas, cento e quarenta, neste caso, usar um programa para as converter num documento em formato *word* e só depois proceder à sua tradução. Esta fase foi frustrantemente longa, uma vez que o programa de conversão finalmente conseguido, após várias experiências falhadas, através das diligências efectuadas pela orientadora, não era totalmente eficaz, pelo que grande parte do texto, esquemas e tabelas teve de ser integralmente transcrita.

Esta fase trabalhosa e demorada de cópia do documento possibilitou, apesar de tudo, um contacto muito directo e detalhado com o próprio texto, permitindo detectar vários traços linguísticos (ex. pág. 97: “Wrap up two (!)”) e até gralhas (ex. pág. 101: “xtract the powder”) e o uso de várias expressões que levantaram dúvidas quanto à pertinência do seu uso no inglês e, nomeadamente, neste contexto. São disso exemplo:

“This is almost certainly due to the fact₁ that” (pág. 13)

“Comparing RF-values obtained from multiple TLC experiments for the same drug are a allowing the calculation of these potential sample errors,” (pág. 29)

“some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial.” (pág. 77)

“a 100 to 400 mg of ethambutol hydrochloride” (pág. 88)

“drug content of an 80 and 100 percent” (pág. 107)

O documento traduzido conjuga o uso de uma linguagem científica e técnica com termos específicos ligados, muitos deles, à farmacologia, com o discurso característico dos manuais de utilização, com instruções que se

querem precisas, explícitas, onde não haja margem para erro, o que, neste caso concreto, pode levar à morte de seres humanos.

“[...] translation is a science, an art, and a skill. It is a science in the sense that it necessitates complete knowledge of the structure and make-up of the two languages concerned. It is an art since it requires artistic talent to reconstruct the original text in the form of a product that is presentable to the reader who is not supposed to be familiar with the original. It is also a skill because it entails the ability to smooth over any difficulty in the translation, and the ability to provide the translation of something that has no equal in the target language.” (Abdellah, 2005: artigo não paginado)

3. Definição da metodologia de trabalho com base no modelo tradutivo de Gouadec

“[...] translation involves the rendering of a source language (SL) text into target language (TL) so as to ensure that (1) the surface meaning of the two will be approximately similar and (2) the structures of the SL will be preserved as closely as possible but not so closely that the TL structures will be seriously distorted.”
(Bassnett, 2008: 11)

Esta definição de tradução afigura-se-nos demasiado simplista e talvez até ingénua, uma vez que coloca a ênfase no texto de partida (TP), que se deverá tentar transpor, tão fielmente quanto possível, para uma língua de chegada (LC), produzindo um texto de chegada (TC) que, poderíamos supor pela leitura desta citação, procure ser o mais fiel possível ao texto de partida, nomeadamente no que diz respeito à estrutura. Porém, os estudiosos centram-se agora mais no texto produzido pelo tradutor e nas linhas orientadoras da sua produção, bem como nos processos que utiliza para conseguir transmitir a mensagem que pretende. Essa sim deve ser fiel ao texto inicial devendo, no entanto, o tradutor adaptar a forma como a transmite de acordo com os conhecimentos, objectivos e cultura do seu público:

“In this intercultural communicative interaction, the translator is the only one who is (by definition) familiar with the conditions and norms of both the source and the target cultures, while the other participants are often not even aware of those of their own culture in contrast with the others. Each of them communicates (as a sender or an initiator or a receiver) according to the conditions of her/his own culture. Due to their familiarity with both cultures, only translators are in a position to discover the conflict potentials (Michael Agar calls them "rich points", 1991: 168) and either avoid them or find a satisfactory solution. Therefore, translators play a powerful role. They could easily deceive their partners without anybody noticing - sometimes just by "faithfully" translating what the source text says.”
(Nord, 2006: 35-36))

Quanto à estrutura, poderíamos analisá-la do ponto de vista da coesão textual, da especificidade lexical ou da construção sintagmática, por exemplo. Não deixando de abordar as outras, por se interligarem, focar-nos-emos mais aturadamente na última, exemplificando e explicitando as transformações

efectuadas na transposição do inglês para o português. Esta reflexão permitirá demonstrar que a ideia que Susan Bassnett defende de tentar manter a estrutura, a nível sintáctico, é utópica.

"The 'products' or 'concepts' being transferred across cultures must be acceptable or made acceptable within the context of the target culture and grasped by those they are supposed to reach and influence. Transfer is therefore cultural in nature first – which means appropriate adaptations of contents, organization, and mode of thinking may have to be made by the translator. The latter has therefore to understand exactly what message has to be carried over to whom before organizing the content of his own message and expressing it in the appropriate code [...]." (Gouadec, 2007: 5-6)

Dada a complexidade do trabalho do tradutor e a necessidade de captar e dominar a mensagem do texto de partida para assim poder transpô-la, numa segunda língua, para um novo texto, torna-se necessário adoptar um método de trabalho.

A definição do método a seguir foi também relevante pelo facto de estarem três tradutoras a trabalhar neste projecto e a delimitação das etapas e até das tarefas e reflexões a executar permitiu organizar o trabalho de forma eficiente.

Passando a referir de forma sucinta em que constavam então as reflexões dos outros dois projectos, temos que a mestranda Diana Proença tomou a seu cargo pesquisar e analisar os termos do domínio em questão e elaborar uma base de dados terminológica (português/ inglês), enquanto que a mestranda Inês Grilo dedicou a sua reflexão à análise do tipo de discurso utilizado nos manuais, tanto no texto de partida, como no texto de chegada.

Para este projecto lançámos mão do modelo de Daniel Gouadec. Neste seu modelo, Gouadec divide o trabalho do tradutor em três fases: pré-tradução, tradução e pós-tradução. Na primeira fase, o autor inclui todo o esforço realizado pelo tradutor até ao momento em que recebe o texto que irá traduzir, como sejam a pesquisa no mercado de trabalho, a negociação com o possível cliente e o acertar de todas as especificações daquele trabalho em particular, por exemplo. Dadas as características específicas deste projecto, poderemos

considerar que este foi comissionado por duas clientes: a representante da Merck – Alemanha, que irá utilizar o produto da nossa tradução e a orientadora do mestrado, que nos propôs realizá-lo como trabalho final do mestrado. Poderemos considerar a Doutora Maria Teresa Roberto como a directora executiva do projecto, com quem estabelecemos os objectivos do mesmo e os procedimentos a seguir para os alcançar. Foi também a mediadora entre nós e a Merck, face às dificuldades de ordem técnica surgidas, para ser possível estabelecer critérios de qualidade adequados ao uso futuro do TT.

A segunda fase, a tradução, é dividida por Gouadec em três etapas: pré-transferência, transferência e pós-transferência.

Durante o período dedicado à pré-transferência, efectuem-se todos os preparativos para a transferência: pesquisas, alinhamento, consolidação terminológica, por exemplo. Estes procedimentos visam a criação de condições tanto quanto possível ideais para a consecução da tarefa principal do tradutor: a tradução propriamente dita, a transferência da mensagem para uma segunda língua-cultura.

Ainda dentro da fase da tradução, temos a pós-transferência, que consiste na adequação do documento produzido aos requisitos e critérios de qualidade exigíveis, previamente à entrega final ao cliente. Pode abranger aspectos linguísticos, técnicos e/ou de formatação.

A fase da pós-tradução engloba todas as actividades posteriores à entrega do material traduzido. Inclui adaptações ao nível do *layout* para fins específicos, consolidação do material terminológico produzido para utilizações futuras e também, se for o caso, os aspectos administrativos e financeiros.

Procederemos, seguidamente, à explicitação e exemplificação do trabalho desenvolvido ao longo destas fases do processo de tradução definidas por Gouadec.

4.Fase de Pré-tradução

4.1 Caracterização do Texto de Partida

A GPHF assume como seus grandes objectivos melhorar as condições de saúde e do fornecimento de medicamentos nos países em vias de desenvolvimento. A grande medida que tomou para os atingir foi a disponibilização de dois importantes bens: o GPHF-Minilab e os manuais que explicam como trabalhar com ele.

O GPHF – Minilab consta de duas malas, contendo cada uma o material e produtos químicos de laboratório essenciais, e ainda comprimidos e cápsulas autênticos, para efeitos de referência. Cada mala contém o material para realizar um dos dois tipos de testes: testes de cromatografia em camada fina e testes colorimétricos. As malas contêm todo o material necessário para a extracção, preparação, pipetagem e aplicação de amostras, como lâmpadas UV, tubos de ensaio, réguas de medição e contentores para armazenamento. Incluem ainda um conjunto completo de padrões secundários de referência para mais de quarenta ingredientes activos e os manuais com os procedimentos de utilização.



Figura 1: GPHF - MiniLab

Estes manuais descrevem os métodos para testar medicamentos. Foram originariamente disponibilizados em inglês, espanhol e francês. Como se pretende agora que sejam usados pelos técnicos de saúde que se encontram no terreno, que lidam com os povos destes países, nomeadamente dos países

africanos, surgiu a necessidade de os traduzir para português, língua oficial destes povos e sua segunda língua, o que foi feito a partir da versão inglesa.

“Se, em vez de se considerar o tradutor um arquivista ou copista que a única coisa que faz é passar a papel químico uma determinada obra de uma língua para outra, mas que, pelo contrário, cria, com base nas ideias expressas noutra cultura (por isso é tradutor), imediatamente se vê que a única coisa que separa o tradutor do criador é a de que o tradutor precisa de um conhecimento (linguístico e cultural) duplo.” (Santos, 2007: 8)

Os manuais descrevem processos de teste para averiguar a genuinidade dos medicamentos, começando pela análise da embalagem, explicitando depois os métodos para verificar se a sua composição corresponde ao que está mencionado no rótulo. Estamos na presença de um texto fonte que contém vocabulário especializado e está redigido num registo cuidado, pois destina-se a profissionais da saúde, que se depreende estarem na posse dos conhecimentos necessários para a compreensão plena do seu conteúdo. Nesta linha, há que referir a transversalidade deste projecto, já que os conhecimentos e, consequentemente, os campos lexicais utilizados, pertencem a domínios como a farmacologia, a química analítica e a fisiologia. Esta transversalidade manifesta-se para além do ecletismo do conteúdo, pois há que referir a componente social de que se reveste este trabalho, uma vez que o texto de chegada será usado para melhorar as condições de vida de vários povos e será uma ajuda de grande valor para os voluntários a trabalhar com eles.

O facto de o texto de partida ser constituído por manuais de utilização confere-lhe ainda outras características: a utilização de um discurso técnico e de orientação, altamente modalizado, que habilita o utilizador do Minilab, com instruções claras, que impossibilitem a existência de dúvidas e, consequentemente, de erros.

A nível estilístico este tipo de texto obriga a que se usem frases curtas e precisas e um léxico específico, do domínio com que se está a lidar, especialmente verbos de acção, com que se referem as tarefas a executar. A sequência destas acções é ordenada através de partículas temporais, que

indicam a organização cronológica das acções, como neste exemplo da página 16:

“First, it must displace the drug from the adsorbent so that it can be carried in the mobile phase across the plate. Secondly, it must help to separate a mixture of drugs, excipients and impurities so that they can be deposited in different places of the chromatoplate and subsequently be identified.”

Os verbos aparecem acompanhados por advérbios ou locuções adverbiais que expressam o modo como devem ser realizadas determinadas acções (ex: “coloque, com cuidado” – pág. 34) As acções aparecem estruturadas, visando um objectivo (ex.: “aguarde cerca de 15 minutos, para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente.” – pág. 34), ou com valor temporal final (ex.: “Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa” – pág. 34).

O manual de que traduzimos as primeiras cento e quarenta páginas refere-se especificamente a testes de cromatografia de camada fina e foi elaborado por Richard W. O. Jähnke, com contribuições de outros especialistas. O autor, consciente do facto de estar a conceber um manual de utilização de um produto, neste caso o GPHF-Minilab, utilizou várias estratégias para se certificar que todos os passos estariam claros: iniciou o manual com explicitação da necessidade e utilidade do produto a usar; descreveu, seguidamente, o material a usar; referiu as regras para o usar com segurança; nomeou e descreveu a forma de realizar cada tipo de teste a as suas diferentes fases; explanou a forma de ler os resultados dos testes. Tudo isto antes de iniciar a descrição dos processos de teste individual para cada fármaco.

“[...] a translated instructions manual or user guide should at least enable the user to perform whatever operations have to be performed and to do this efficiently and safely. This means cuts and additions may have to be made [...]” (Gouadec, 2007: 5)

Após a descrição detalhada dos métodos a utilizar, encontramos nos manuais a indicação dos procedimentos a seguir para testar a fiabilidade de

medicamentos e da quantidade e acção dos fármacos, ou substâncias activas que contêm. Seguem uma estrutura semelhante para cada fármaco, como se exemplifica com o caso da primeira substância, o ácido acetilsalicílico, ou aspirina:

-Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

1. Inspeção visual
2. Teste de desagregação
3. Resultados e medidas a tomar

-Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

1. Princípio
2. Equipamento e reagentes
3. Preparação da solução stock do padrão
4. Preparação da solução padrão de trabalho a 100% (concentração limite superior de trabalho)
5. Preparação da solução padrão de trabalho a 80% (concentração limite inferior de trabalho)
6. Preparação da solução stock de um produto que supostamente contém 100 mg de aspirina por unidade

300 mg de aspirina por unidade

500 mg de aspirina por unidade
7. Preparação da solução amostra de trabalho
8. Aplicação da amostra e dos padrões
9. Eluição

10. Revelação

11. Placa cromatográfica observada com uma luz ultravioleta de 254 nm

1ª corrida: concentração limite superior da aspirina, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: concentração limite inferior da aspirina, representando 80% do fármaco.

(mancha do solvente)

Mancha principal

Mancha secundária indicando ácido salicílico

(Linha de base)

12. Observação a 254 nm

13. Observação à luz do dia após coloração com iodo

14. Resultados e medidas a tomar

Para realizar os testes, a Merck disponibiliza um kit que contém o material básico necessário. A par com a descrição dos procedimentos a seguir para efectuar os testes aos fármacos, estão também contidas nos manuais imagens que os exemplificam, outras com legendas para descrever o próprio material a usar e outras para exemplificar os resultados que se pretende obter.

4.2 Definição da Metodologia Tradutiva com base na Teoria Skopos

“Various appeals are made to the need to “unlearn” the teachings of equivalence, linguistic exactitude, and an apparently primitive concept of translation. (Pym, 2010: 6)

Na sua apresentação de *Translation Theory as Historical Problem-Solving*, Anthony Pym faz uma análise um tanto depreciativa das várias teorias de tradução que apareceram ao longo dos tempos, reduzindo-as a uma tentativa mais ou menos bem sucedida de dar resposta a problemas pontuais, que surgiram em pontos específicos da história da civilização ocidental, como se pode constatar neste excerto:

“All that would be a very new set of problems to which Skopos theory could have been an elegant set of answers. [...] Nord tends to mention the cultural adaptation of tourist brochures, but the tourist industry had been around for a long time, and Holz-Mänttari has intelligent things to say about translators working alongside field-experts, but technical expertise was surely nothing new either.” (Pym, 2010, 6)

No entanto, este autor considera, na sua obra *Exploring Translation Theories*, a teoria *skopos*, de Vermeer, a chave para um novo paradigma, por oposição às ideias que dominavam anteriormente, que preconizavam que o princípio da equivalência presidisse ao acto tradutológico.

“The novelty of this approach thus lies in what it does not say. For this paradigm, the translator’s choices need not be dominated by the source text, or by criteria of equivalence, unless of course the source text and equivalence happen to be stipulated as essential for the purpose.” (Pym, 2010: 44)

Jeremy Munday também refere esta teoria e defende que é crucial, para o tradutor, saber o porquê de o texto de partida necessitar de ser traduzido e qual será a função do texto de chegada.

“Skopos theory focuses above all on the purpose of the translation, which determines the translation methods and strategies that are to be employed in order to produce a functionally adequate result”. (Munday, 2001: 79)

De facto, o conhecimento do uso específico que o público-alvo do TC lhe daria esteve constantemente presente no decorrer da tradução do TP. Mas também o facto de não se ter a certeza de quem constituiria esse público esteve na base das decisões relativas às estratégias ao nível da estrutura sintáctica utilizadas para transpor a mensagem para a TL, de forma a esta realizar efectivamente a sua função.

Daí que o papel do tradutor não se tenha aqui limitado à transferência de informação, mas tenha antes procurado ser um meio de fazer chegar a mensagem a um público mais vasto, talvez menos especializado, embora actuando dentro do mesmo contexto, na área da saúde e farmacologia.

“[...] one of the most important factors determining the purpose of a translation is the addressee, who is the intended receiver or audience of the target text with their culture-specific world-knowledge, their expectations and their communicative needs. Every translation is directed at an intended audience, since to translate means ‘to produce a text in a target setting for a target purpose and target addressees in target circumstances’. (Vermeer, 1987: 29)”. (Nord, 2007: 12)

Não se perderam de vista, durante este processo, os critérios de coerência e de fidelidade que perpassam a teoria *Skopos*.

Analisar-se-ão, mais à frente, as estratégias utilizadas para fazer passar essa mensagem e, mais concretamente, as diferenças entre o TP e o TC ao nível da estrutura sintáctica.

5.Fase de Tradução

5.1 Pré-transferência

5.1.1 Recursos e Meios de Apoio à Tradução

O primeiro contacto com o texto de partida revelou imediatamente a existência de um elevado número de termos ligados à medicina, à farmacologia, à química analítica e à fisiologia, como se pode verificar através dos seguintes exemplos, retirados do TP:

“The container can be anything from a glass bottle to a blister pack or a tube made of metal and a securitainer made of plastic. These primary or immediate containers are very often protected by a folding carton normally containing a leaflet explaining the dosing regime and the drug's action or side effects.” (pág. 11)

“The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 300 mg of acetylsalicylic acid. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle.” (pág. 33)

Daí que se tenha considerado, desde o início, por motivos de coesão tradutológica, a necessidade de realizar um levantamento da terminologia específica, até porque estariam três tradutores a trabalhar neste projecto e impunha-se uniformizar os textos produzidos, primordialmente ao nível terminológico, não esquecendo também outros aspectos, como o registo.

Este levantamento teve então em vista a coesão textual, essencial para que o receptor do TC identifique e descodifique rápida e correctamente os segmentos linguísticos, ligados entre si por uma lógica inerente à fluência textual.

“[...] It is in many ways the density and progression of cohesive ties throughout a text that are important. This web of relationships may have to differ between ST and TT, since the networks of lexical cohesion will not be identical across languages.” (Munday, 2001: 99)

Na primeira etapa da tradução, em que somente algumas páginas foram trabalhadas, realizou-se apenas esse levantamento, após validação da tradução por um especialista da área.

Já na segunda fase deste projecto, em que se concluiu a tradução dos manuais, procedeu-se à elaboração de um glossário. Nesta fase foi usado um programa de tradução, o MemoQ, que permitiu utilizar uma memória de tradução e criar uma base de dados passível de ser partilhada pelos três elementos do projecto, o que constituiu a razão primordial por que foi escolhido.

Como foi já referido, houve a necessidade de digitalizar e converter o texto de partida para um formato de texto (doc), para possibilitar a sua manipulação e a utilização do programa de tradução e permitir ainda o alinhamento e comparação dos dois textos, o TP e o TC, ao nível da extensão dos segmentos linguísticos. Para a conversão do texto, já digitalizado, recorreu-se ao programa Omnipage, que faz a leitura das imagens digitalizadas. Apesar de este programa ter sido a melhor opção para resolver este problema, a sua utilização esteve longe de constituir a solução ideal, pois foi necessário transcrever muita informação.

Outra razão para a opção da não inclusão das imagens na transcrição do texto, tomada nesta etapa, foi o facto de que esta implicaria a aquisição e domínio da utilização de programas de tratamento de imagem. Para legitimar esta decisão pesou também o facto de a representante da Merck ter indicado que seria desnecessário incluir as imagens, uma vez que, aquando da impressão do TC, este seria anexado ao texto inglês, permitindo aí visualizar as imagens. No entanto, considerou-se absolutamente pertinente a tradução das suas legendas, que se procurou transcrever de forma a que o utilizador do manual as associe sem dificuldade à respectiva imagem. Para isso, manteve-se o mesmo tipo de letra e de numeração.

5.1.2 Materiais de referência e tipificação de fontes

Gouadec divide a tradução especializada em várias sub-categorias, que incluem a tradução técnica e a tradução biomédica e farmacêutica, nas quais podemos incluir o nosso texto de partida.

Dada esta especificidade dos domínios tratados, revelou-se necessário consultar documentos que lidassem com estas áreas de especialidade, obras de referência produzidas pelo INFARMED, como o Vademecum, por exemplo, de que constam, em inglês e português, a classificação farmacoterapêutica de medicamentos; denominações comuns das substâncias activas de medicamentos; designações normalizadas: formas farmacêuticas, vias de administração, recipientes e sistemas de fecho. Outras obras referentes a farmacologia, nas duas línguas, e à farmacopeia portuguesa, foram necessárias à compreensão do texto de partida e à elaboração do texto de chegada. Também textos de referência relativos a tecnologia farmacêutica e terapia medicamentosa, testes de segurança no âmbito da química analítica e equipamento científico de laboratório foram usados nesta fase de “technical study of the subject concerned” (Gouadec, 2007: 70).

A identificação prévia de determinados desafios tradutológicos ao nível terminológico conduziu a uma pesquisa, por vezes, infrutífera, dada a escassez de material específico e de qualidade disponível em português. Casos houve, sobretudo em relação a utensílios usados nos processos de teste, em que só mesmo o contributo do consultor e validador tornou possível a deliberação quanto ao termo a usar, pois as pesquisas não haviam produzido frutos, nem mesmo recorrendo ao seu alargamento a documentos de origem brasileira, e à análise de imagens, como forma de obviar a falta de material em português europeu e de tentar compreender a mensagem do texto original, para assim a transmitir ao público-alvo de uma forma clara, facilmente perceptível.

Esta busca de documentação adicional teve ainda como base a tipologia textual do TP, constituído por manuais, que são textos técnicos, modalizados, com características muito próprias e bem definidas, as quais estiveram na origem de algumas opções terminológicas, sobretudo ao nível da explicitação

das instruções. Não só foram analisados outros manuais de instruções de equipamentos mas também bulas e embalagens de medicamentos.

Os manuais traduzidos têm ainda uma particularidade que constituiu, por vezes, fonte de dúvidas quanto à compreensão do PT e, conseqüentemente, quanto à melhor forma de transpor a mensagem para o português, que é o facto de terem sido redigidos por vários estudiosos alemães. Algumas opções linguísticas por si tomadas levaram a pesquisas relativas a questões de ordem linguística, como aspectos lexicais, gramaticais, sintácticos, pontuação, tipo de registo, idiomatismos e convenções linguísticas próprias deste género de texto. Estas pesquisas foram ainda essenciais para a análise aprofundada das diferenças entre o TP e o TC ao nível da construção sintáctica. Como se pode verificar pela listagem da bibliografia consultada, houve a necessidade de visitar determinados aspectos estruturais, indo ao pormenor da análise gramatical das duas línguas em questão, para fazer face, até, ao constante evoluir dos estudos linguísticos. No entanto, a este nível, a quantidade de conhecimentos com que se tomou contacto pela primeira vez suplantou em larga escala a dos revisitados.

5.2 Fase de Transferência

“By means of a comprehensive model of text analysis which takes into account intratextual as well as extratextual factors the translator can establish the function-in-culture of a source text. This is then compared with the (prospective) function-in-culture of the target text required by the initiator, identifying and isolating those ST elements which have to be preserved or adapted in translation.” (Nord, 2005: 24)

Estando agora identificada a tipologia do texto de partida e tendo sido já preparados todos os materiais de apoio e o próprio texto, a fim de poder ser manipulado através do programa de tradução, parte-se para a fase de transferência da mensagem para a língua-cultura de chegada.

“According to the assessment of the audience’s communication background, a text producer not only selects the particular elements of the code that will be used in the text but also cuts or omits altogether any details which can be “presupposed” to be known to the receiver, whilst stressing others (or even presenting them with extra information) in order not to expect too much (nor too little) of the addressed readership.” (Nord, 2005: 59)

À luz da teoria *Skopos*, de Vermeer, o tradutor deve orientar o seu trabalho com base no propósito comunicativo da tradução e no fim que o receptor do texto lhe dará – a sua finalidade, a função que executará. Com este fim em mente, procura-se reger o processo tradutológico por critérios que assegurem não só a coesão e coerência (intertextual e intratextual), mas também a fidelidade à função do texto de chegada, quer seja a mesma do texto de partida, quer seja a que deverá exercer sobre o público-alvo. Vermeer prevê que o tradutor tenha liberdade de escolher as alterações a implementar, bem como quais os elementos que irá preservar, reduzir ou mesmo omitir e os recursos linguísticos e estilísticos de que se socorrerá para alcançar estes propósitos.

As decisões do tradutor deverão ter em consideração o que Baker define como “pragmatic inference” (Baker, 1992: 227), pois a coerência do texto será o resultado da interacção entre o conhecimento apresentado no texto e o conhecimento que o leitor tem, fruto da sua formação e da sua experiência, influenciada por variados factores, tais como a idade, etnia, escolaridade e

crenças, por exemplo. Estes factores condicionam a forma como o receptor do texto capta a mensagem e a quantidade e qualidade da informação que reconhece e assimila.

“Even a simple cohesive relation of co-reference cannot be recognized, and therefore cannot be said to contribute to the coherence of a text, if it does not fit in with a reader’s prior knowledge of the world.” (Baker, 1992: 219-220)

Os processos tradutológicos utilizados na transferência da mensagem e as estratégias de tradução de que nos socorremos para ultrapassar os problemas surgidos serão em seguida apresentados com exemplos concretos, procurando destacar as estratégias usadas a nível pragmático, estilístico e sintáctico para atingir os objectivos comunicacionais pretendidos, numa perspectiva de comparação entre o inglês e o português.

5.2.1 Problematização de questões tradutológicas a nível pragmático

“ [...] é preciso compreender para traduzir, e um tradutor precisa de conhecer o assunto sobre o qual está a re-redigir, assim como os métodos de o exprimir e comunicar, na língua original e ainda mais na língua de destino.” (Santos, 2007: 9)

Ao transpor a mensagem do texto original para o português e, considerando o facto de não podermos estar certos de que os utilizadores do TC dominem as áreas do conhecimento científico que ele abrange, face às condições deficitárias existentes nos países em vias de desenvolvimento, impôs-se a necessidade de, mantendo o mesmo tipo de registo, tentar explicitar os procedimentos a seguir, de forma a não dar azo a dúvidas, pois a gravidade das suas consequências é demasiada para se correr o mínimo risco de estas existirem. Preservou-se o recurso ao discurso de especialidade, pois o teor dos textos assim o exige, mas procurou-se lançar mão de estratégias discursivas que optimizassem a compreensão da mensagem, face ao desconhecimento do grau e tipo de formação do público-alvo.

Uma das estratégias utilizadas foi a segmentação da informação, como no exemplo seguinte, extraído da página 8, em que se manteve a informação

essencial na primeira frase e se transpôs os elementos acessórios para uma segunda frase:

Texto de partida:

“Minilabs can be customised to cater for specific project needs, for example using TLC equipment and reference standards for antimalarial drug quality verification only.”

Tradução:

“Os Minilabs podem ser feitos por encomenda, para atender às necessidades específicas de cada projecto. Por exemplo, pode usar-se apenas equipamento de CCF e padrões de referência para a verificação da qualidade de fármacos antimaláricos.”

Já na secção inicial dos manuais, em que se dá a conhecer a organização que tem a seu cargo a distribuição do Minilab e a formação acerca do seu uso e a forma de executar correctamente os testes aos medicamentos, pode-se verificar o cuidado em utilizar um discurso promotor da desambiguação da mensagem.

Texto de partida:

“The container can be anything from a glass bottle to a blister pack or a tube made of metal and a securitainer made of plastic. These primary or immediate containers are very often protected by a folding carton normally containing a leaflet explaining the dosing regime and the drug's action or side effects. Tablets and capsules can be presented in a single or multi unit dose container, for example in a blister pack or bottle respectively. [...] Indeed, there is a sense that there are as many different types of packaging used in the pharmaceutical industry as the products they contain.”

Tradução:

“A embalagem primária⁽¹⁾ pode ter variadas formas⁽²⁾, desde um frasco de vidro a um blister, um tubo de metal ou um recipiente PP (securitainer), feito de plástico⁽³⁾. Estas embalagens primárias ou imediatas, que estão em contacto directo com os medicamentos⁽⁴⁾, estão frequentemente protegidas por uma caixa de cartão, que contém, normalmente, um folheto a explicar a posologia, a acção do fármaco e os efeitos secundários. Os comprimidos e as cápsulas podem apresentar-se numa

embalagem unidose, como um blister, ou com várias unidades juntas, como um frasco⁽⁵⁾. [...] De facto, dá a sensação que, na indústria farmacêutica, a variedade dos tipos de embalagens usada é tão grande como a dos produtos que elas contêm⁽⁶⁾.”

Este extracto da página 11 contém exemplos de várias estratégias ao serviço da desambiguação dos conteúdos, que passamos a enumerar:

(1) e (4) – decidiu-se aqui inserir informação extra, que não constava do texto original, para explicitar a que embalagens nos estamos a referir, por oposição às embalagens exteriores, que condicionam estas primárias. Para tal, fez-se uso, no primeiro caso, do adjectivo “primária” e, no caso (4), de uma oração relativa, que introduz informação extra;

(2) – a tradução de “can be anything” por “pode ter variadas formas” prendeu-se com o carácter demasiado vago do vocábulo inglês “anything”, tendo-se considerado que esta expressão portuguesa não só contribuía para uma mais correcta apreensão da mensagem mas também se adequava melhor ao tipo de texto que estávamos a trabalhar;

(3) – também aqui se aumentou a quantidade de informação disponibilizada, tendo-se optado por incluir a designação com maior distribuição em português, outra designação, mais internacional, entre parêntesis, para o caso de ser melhor reconhecida e ainda manter a descrição do material em que é produzida;

(5) – a estratégia aqui usada, para não dar azo a interpretações desadequadas, foi a da alteração da ordem dos componentes da frase. Se no texto original temos primeiro a enumeração dos elementos e depois os exemplos, no texto de chegada cada exemplo vem imediatamente a seguir ao artigo a que se refere;

(6) – esta última frase do parágrafo foi reformulada, tendo-se criado um complemento circunstancial de lugar entre vírgulas, segmentando a informação, após o qual se optou, no TC, por usar o nome “variedade”, que é a ideia-chave que se quer transmitir, enunciando seguidamente os dois itens que estão a ser comparados.

Na página 23 a frase “A jar with a lid serves as developing tank.” foi transformada em “Como câmara de eluição usa-se um frasco com tampa (de rosca).”. Passou-se a iniciar a frase com a função que se pretende que o objecto execute, o propósito da tarefa, introduzida pela conjunção “como”, alterou-se a conjugação do verbo para uma forma reflexa impessoal e acrescentou-se informação: “(de rosca)”.

Os advérbios “here” e “there” foram recorrentemente traduzidos por expressões que explicitam aquilo a que se referem, como se demonstra nos exemplos que apresentamos a seguir.

Texto de partida:

“Leave the plate to sit there for about three minutes.”

Tradução:

“Deixe a placa repousar, no interior do frasco, durante cerca de três minutos.”
(pág. 24)

Texto de partida:

“Here, the sample spot on run number 3 fails to meet the size and intensity of the reference spots on run number 1 and 4 representing the higher (100%) and lower (80%) standard, respectively.”

Tradução:

“Neste teste, a mancha da amostra na corrida número 3 não corresponde ao tamanho e intensidade das manchas de referência nas corridas números 1 e 4, que representam o padrão superior (100%) e o inferior (80%), respectivamente.”
(pág. 27)

Texto de partida:

“Here, the sample spot on run number 2 contains no sulfamethoxazole and no trimethoprim.”

Tradução:

“Neste ensaio, a mancha da amostra na corrida número 2 não contém sulfametoxazol nem trimetopim.” (pág. 27)

Outra estratégia usada, para assegurar a transparência da mensagem e facilitar assim a sua compreensão por parte dos utilizadores dos manuais, foi a transposição de expressões negativas para uma forma afirmativa, como se pode verificar através deste exemplo retirado da página 34.

Texto de partida:

“Although their intensities might differ, their diameters never should.”

Tradução:

“Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual.”

Na página 45 encontramos outro exemplo de explicitação do conteúdo. Se no texto inglês encontramos o advérbio (“accordingly”), já no texto português deparamo-nos com uma segunda oração gerundiva separada da principal por uma vírgula e iniciada por um verbo no gerúndio, que descodifica a mensagem implícita contida nesse advérbio, explicando como se deve proceder à acção preconizada na oração principal, em que é usado um verbo no modo imperativo.

Texto de partida:

“Label the bottle accordingly.”

Tradução:

“Rotule o recipiente, indicando o conteúdo.”

5.2.2 Problemática de questões tradutológicas a nível estilístico

“The whole point of a user guide is to convey enough information to users to allow them to perform tasks as quickly and as easily as possible and with a minimum of confusion and effort. (...) Appropriate language usage, which also reinforces the clarity of the guide, means users will not have to waste valuable time deciphering ambiguous sentences or phrases.” (Byrne, 2006: 60)

Foi com esta premissa em mente que se compôs o texto de chegada e se procurou solucionar as dúvidas que foram ocorrendo durante o processo de tradução. Embora Byrne se esteja aqui a referir a outro tipo de manuais, estas características são válidas para qualquer um: o manual deve guiar o seu utilizador de forma clara. Neste caso, em que estamos a lidar com testes a medicamentos, a responsabilidade do tradutor é imensa, dadas as possíveis consequências que a não compreensão das instruções poderá acarretar.

Byrne cita Weiss, referindo que este preconiza que o tradutor assuma o controlo do leitor e do processo de comunicação, justificando esta sua afirmação com o facto de este, apesar de não possuir conhecimento suficiente para avaliar e compreender a leitura e apreensão da mensagem por parte do leitor, sabe o suficiente para perceber o que o distrai ou causa interferência no processo de leitura e compreensão.

“Thus, in removing sources of “noise and error” and things which we know will interfere with the correct and effective use of the guide we are in a sense assuming control over the reader and the communicative act.” (Byrne, 2006: 61)

Foi com esta realidade em mente que se efectuaram determinadas alterações, chegando a eliminar-se, por vezes, elementos que se considerou poluírem a mensagem a transmitir, prejudicando a sua captação imediata pelo leitor que, nalguns casos, não dominará completamente o português, sobretudo ao nível do discurso escrito, uma vez que não é esta a primeira língua dos povos africanos.

Mas a maioria das alterações efectuadas, visando a explicitação dos conteúdos, conduziu antes à inclusão de elementos explicativos, como se pode ver no exemplo seguinte, passando também pela segmentação das frases através da pontuação, quer criando novos complementos, orações ou até frases.

Texto de partida:

“All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Aspirin Stock Sample Solution*'.”

Tradução:

“Todas as soluções amostra produzidas devem, no fim do procedimento, conter 10 mg de fármaco na forma pura por ml e ser rotuladas como “*Solução Amostra do Padrão de Aspirina*.” (pág. 33)

Um dos aspectos que condicionam um texto quanto às opções ao nível lexical e também ao nível da estrutura sintáctica é o registo com que lidamos. O tipo de texto, ou género textual, determina o modo como se estrutura o discurso, como se inicia, desenvolve e finaliza o texto e também o registo a utilizar.

“While registers impose explicitness constraints at the level of vocabulary and syntax, genres impose additional explicitness constraints at the discourse level [...] Unlike register, genre can only be realized in completed texts or texts that can be projected as complete, for a genre does more than specify kinds of codes extant in a group of related texts; it specifies conditions for beginning, continuing, and ending a text.” (Couture, 1986: 82)

Daí que se tenham efectuado algumas alterações por se ter considerado que o tipo de discurso usado no texto de partida não se adequava ao tipo de texto produzido. Transcreve-se aqui alguns exemplos em que o registo se nos afigurou demasiado oral e informal:

Texto de partida:

“[...] some health care providers might decide not to pay the bill, [...]”

Tradução:

“[...] alguns prestadores de cuidados de saúde podem decidir não os pagar, [...]”
(pág. 5)

Texto de partida:

“And finally, the sheer likelihood that the crime might get detected even far afield in rural areas might send a warning signal to the smart persons behind the crime [...]”

Tradução:

“Concluindo, a mera possibilidade de o crime poder ser detectado, mesmo nos locais rurais mais remotos, pode dar um sinal de aviso às pessoas que são responsáveis pelo crime [...]” (pág. 5)

Resolvemos, neste caso, não só não manter o registo familiar do texto de partida, (“smart persons”) mas também não traduzir a expressão “behind the crime” por “por detrás do crime”, expressão que estaria correcta em português, pois, sendo uma expressão usada aqui com um sentido idiomático, poderia não fazer parte dos conhecimentos lexicais do leitor. No que se refere à tradução das expressões idiomáticas, Mona Baker afirma que a tradução destas expressões não se limita à existência ou não de expressões equivalentes na língua de chegada, mas depende também de outros factores, dos quais destacamos “the appropriateness or inappropriateness of using idiomatic language in a given register in the target language.” (Baker, 1992: 72). Optámos então por traduzir a expressão por “pessoas que são responsáveis”, expressão que contém um significado mais directo e que, pelo facto de o adjectivo “responsáveis” ter uma grafia e características fonéticas muito semelhantes em várias línguas, afigurou-se-nos de maior probabilidade de ser reconhecido até por habitantes locais com reduzida formação, uma vez que, estando a usar o Minilab deverão ter contacto com falantes de outras línguas. A decisão de usar o pronome relativo “que” teve por base o propósito de desambiguar e clarificar o texto, determinando com exactidão que não nos estamos a referir a pessoas responsáveis, ou seja, com carácter, mas sim àquelas responsáveis pelos crimes.

Refira-se, ainda a propósito da expressão “smart persons”, que a tradução da mesma teve também em conta a máxima “Be polite” mencionada por Baker (Baker, 1992: 235). Podemos até considerar que também a máxima da relevância também foi aqui aplicada, uma vez que a inclusão do adjectivo “esperto” ou até “espertalhão”, não só estaria aqui desadequada ao contexto, já que o leitor apenas espera encontrar informação precisa, directa e científica, mas também nenhuma informação pertinente traria ao texto.

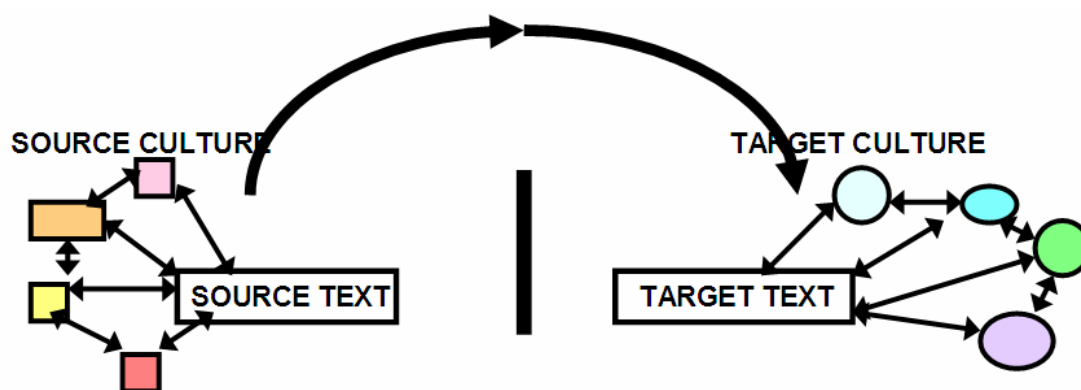
Texto de partida:

“Copycats: (from left) the hologram from a genuine pack of antimalarials, a silver foil copy, and two more convincing fakes.”

Tradução:

“Cópias: (da esquerda para a direita) o holograma de uma embalagem de antimaláricos genuína, uma cópia de folha de prata e duas outras falsificações mais convincentes.” (pág. 12)

Ao traduzir esta frase considerou-se a hipótese de usar o vocábulo “arremedos”, que seria a tradução mais fiel. No entanto, optou-se por “cópia” por ser uma palavra com maior distribuição, daí ter maior probabilidade de ser reconhecida. A tradução por “falsificações” teve de ser descartada devido ao facto de se usar essa palavra mais à frente, ainda na mesma frase, tendo-se considerado que, por razões estilísticas, não se deveria repeti-la. Face aos objectivos do texto de chegada, estes critérios estilísticos não foram a principal preocupação mas, sempre que possível, procurou-se a obtenção de um texto que proporcione uma leitura clara e de fácil apreensão mas que não se desvie muito dos critérios estilísticos da língua de chegada. Tal como ilustra Nord:



” Fig. 1. Intertextuality in translation

Looking at Fig. 1, we see that both the source and the target text form part of a system of intertextual relationships. This means that the effect of the target text can be predicted comparing it to the (possible, normal, usual) effects of existing texts from the target culture. If the text conforms to conventional patterns of a particular class of texts, the text form will not attract the readers' attention, which allows for an easier processing of the information contained in the text. On the other hand, if

a text shows strange, unconventional form patterns, the audience may wonder why the author chose these original forms and whether they are meant to convey an extra amount of information.” (Nord, 2006: 39)

Ora não se pretende aqui que o leitor perca tempo a questionar-se acerca do significado não só de itens lexicais, como referimos atrás, mas também de estruturas anormais para o tipo de texto com que está a lidar.

Daí que se tenha seguido, consciente e fielmente, a estrutura deste tipo de texto injuntivo – o manual de instruções - que contém a enumeração de um conjunto de etapas, cronologicamente ordenadas, da execução de uma acção.

Texto de partida:

“Add 10 drops of glacial acetic acid, close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour.”

Tradução:

“Adicione 10 gotas de ácido acético glacial, feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos, para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente.” (pág. 34)

Relativamente à conjugação verbal, das três hipóteses de tradução de instruções para o português, decidimos usar a 3ª pessoa do conjuntivo (forma supletiva do modo imperativo), para transmitir as instruções, como se pode verificar através do exemplo transcrito, em detrimento do uso de formas mais impessoais (presente do Indicativo com sujeito indeterminado ou infinitivo). Em inglês, a forma verbal abrange estas três formas mencionadas para o português, daí a possibilidade e a necessidade de tomar uma decisão, ao passar a mensagem para português.

Apesar de perpassar por todo este trabalho a noção já várias vezes frisada de que se pretende obter um texto claro, com frases directas, importa realçar uma estratégia utilizada no texto de partida que considerámos de extrema eficácia e que, por esse motivo, mantivemos na tradução: o uso de comparações e metáforas para permitir ao leitor “visualizar” os procedimentos a realizar e os resultados a obter. Para estas imagens o autor do TP munuiu-se de

vocabulário ligado ao desporto, mas que não exige que o leitor seja adepto ou grande conhecedor de nenhuma das modalidades a que alude. No último exemplo que apresentamos é feita uma comparação utilizando vocabulário ligado aos automóveis.

Texto de partida:

“The GPHF-Minilab acts as first-line defence against counterfeit and substandard medicines [...]”

Tradução:

“O GPHF-Minilab funciona como primeira linha defensiva contra os medicamentos falsificados e os de baixa qualidade [...]” (pág. 2)

Texto de partida:

“Surprisingly, those drugs deposited midway between both lines will be the winner of the game.”

Tradução:

“Surpreendentemente, esses medicamentos depositados a meio caminho, entre as duas linhas, serão os vencedores deste jogo.” (pág. 14)

Texto de partida:

“A microscope slide coated with eight grams of such an adsorbent will easily match the size of a football pitch, which is truly a huge 'racing course' for such small things like molecules.”

Tradução:

“Uma lâmina de microscópio revestida com oito gramas desse adsorvente facilmente atingirá o tamanho de um campo de futebol, que é uma distância enorme para partículas tão pequenas como as moléculas “correrem”. (pág. 15)

Texto de partida:

“It's like automobiles. Some run on unleaded petrol, others only on petrol spiked with lead and some others just won't run.”

Tradução:

“É como o que acontece com os automóveis. Uns funcionam a gasolina sem chumbo, outros só a gasolina com chumbo e ainda outros simplesmente não funcionam.” (pág.16)

Ainda numa outra situação o uso idiomático das expressões “tear drops” e “tailing”, que o autor do manual incluiu até entre aspas, tão eficaz em inglês, surtiria um efeito estranho se estas fossem traduzidas literalmente, pelo que se optou por as parafrasear e até, por motivos de ordem estilística, trocar a sua ordem.

Texto original:

“Run No. 2: When applying too much sample the overloading may cause 'tear drops' or 'tailing'.”

Tradução:

“2ª corrida: Se se aplicar uma quantidade excessiva de amostra, o excesso de quantidade pode originar manchas arrastadas ou com formato de lágrima.” (pág. 30)

5.2.3 Problemática de questões tradutológicas a nível sintáctico

“Communication through written language can only assume as much common background with the reader as the situation allows, and has no facial expression, body language and cueing to provide feedback on how communication is progressing. Therefore, written language has to organise, control and concentrate the information of several clauses, or communication units, into sentences.” (Maia, 1996: 4)

Não foram somente questões estilísticas e de ordem pragmática que estiveram na base das transformações operadas durante o processo de tradução, que podemos até designar por recriação do texto de partida. Estamos a lidar com duas línguas com características diferentes, em que a construção frásica, nosso objecto de estudo neste trabalho, se rege por regras diferentes, a que é imprescindível obedecer.

No seu artigo *The Sentence as a Unit of Translation* (1996), em que se debruça sobre as diferenças entre o inglês e o português, Maia aponta como pontos cruciais da análise sintáctica a extensão da frase, a ordem dos elementos da frase e a relação entre frases.

♦ Extensão da Frase

Desta sua análise comparativa de textos paralelos em inglês e português, Maia conclui que a extensão média das frases inglesas é mais curta do que a das frases dos textos portugueses, o que não é, de todo, surpreendente. Mas este seu estudo contrastivo permitiu-lhe ainda chegar a outra constatação – esta realidade varia de acordo com o tipo de texto. Quando se trata de determinados tipos de texto, como entrevistas ou artigos de revistas, a extensão das frases mantém-se idêntica nas duas línguas. Já nos textos de carácter mais sério ou académico, a extensão das frases portuguesas aumenta, o que reflecte uma diferença cultural que aponta para a valorização da capacidade de produzir unidades de informação longas. Através da produção destas unidades sintácticas longas, o autor denota a intenção de mostrar a sua capacidade de formulação de enunciados com várias unidades de informação interligadas, capacidade esta que é otimizada pela sua

formação académica, que quer tornar patente, o que constitui a intenção funcional destas frases.

A sintaxe do português, com os seus sistemas de concordância, permite o uso de várias técnicas, como a aposição, a inserção de várias orações subordinadas e outras formas de qualificação. Em inglês não é possível usar estruturas semelhantes, pois corre-se o risco de haver ambiguidade, dado que esta língua não possui esta característica sintáctica, que permite uma tão grande flexibilidade.

“Critical views of academic language are held by speakers of both languages. One refers to the richness of Portuguese style versus the English inability to conceptualise in a complex manner – or Portuguese pomposity versus the synthetic and concise style of English - depending on one’s point of view.” (Maia, 1996: 7)

Face a esta diferença linguístico-cultural, Maia descarta a hipótese de o tradutor poder, então, simplesmente proceder a uma operação de adaptação da extensão das frases à língua de chegada.

“If a Portuguese writer has constructed a 115 word sentence, one will naturally need considerable knowledge and control of English to put all the information into one English sentence - and, of course, one could say the same of the Portuguese writer in relation to Portuguese. However, if one tries to break it up, one may lose the thematic thrust of the message, and also run the risk of making the translation even longer by having to repeat lexical and syntactic structures which have been ellipted in the original. Similarly, joining up the shorter English sentences of the English academic tradition to make a more ‘respectable’ Portuguese text is not as straightforward as it might seem.” (Maia, 1996: 7-8)

Cada frase constitui um todo, uma unidade semântica. Não se trata apenas de dissecar ou acoplar frases, é necessário atender à forma como a mensagem é transmitida, como as ideias estão organizadas, a aspectos como a tematização e a rematização, não esquecendo as diferenças estruturais das duas línguas com que se está a trabalhar.

Seguindo estas considerações e, como já vimos, com o propósito de clarificar, organizar e hierarquizar informação fornecida no TP, para facilitar a sua assimilação, numa perspectiva pragmática de funcionalidade do uso dos manuais, optou-se, por vezes, pela segmentação de determinadas frases

inglesas, contrariando esta constatação de que a extensão média das frases portuguesas é, comparativamente, mais longa. Transcreve-se aqui um exemplo constante da página 34 do documento em tradução.

Texto original:

“Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.”

Tradução:

“Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.”

Considerou-se, neste caso, que a informação extra quanto ao uso da placa não era essencial para a frase principal, que contém a informação que importa reter. É adicional, pode até nem ser necessária, daí que se tenha relegado esta informação para uma segunda frase, iniciada com a expressão de condição.

♦Ordem / Disposição dos Elementos na frase

Uma área de extrema importância no que diz respeito à problemática da estrutura frásica é a ordem ou disposição dos elementos na frase. Esta ordem está dependente de vários condicionalismos psicológicos e culturais, segundo defendem vários estudiosos, como Halliday, que, segue a linha de pensamento de Trávníček, que afirma que o tema é ‘the sentence element that links up directly with the object of thought, proceeds from it and opens the sentence thereby’. (Trávníček, 1961)”. (Halliday, 1974: 53, apud Morais, 1998: 17)

Cada língua tem o seu modo próprio de organização das ideias e o português e o inglês variam significativamente, segundo Belinda Maia apurou através da análise de frases nas duas línguas.

Esta premissa da base psicológica que rege a produção de enunciados, que Halliday subscreve, conduz-nos às noções de tema e rema que preconiza. Embora afirme que “The theme of the clause is the element which, in English, is put in first position.” (Halliday, 1970: 161, apud Morais, 1998: 11) Halliday

esclarece que não é o facto de um elemento da frase estar na posição inicial que o define como tema dessa frase. Essa posição é uma causa, um meio de pôr em prática a função de “tema” na gramática inglesa e não a razão da marcação temática.

“O tema de uma frase é, nesta concepção do tema frásico, o seu primeiro constituinte, independentemente da categoria sintagmática em causa. Em línguas SVO, o constituinte inicial é tipicamente o sujeito da frase, verificando-se quase sempre, por conseguinte, uma coincidência entre as estruturas sujeito-predicado e tema-remata.” (Morais, 1998: 11)

Ligadas a estas duas noções de tema e remata surgem as de informação já conhecida (“given”) e informação nova (new”), que condicionam a estrutura temática da frase. Com efeito, alguns estudiosos, incluindo Halliday, definem a estrutura tema/remata com base na distinção entre unidades que transmitem informação conhecida e unidades que transmitem informação nova. Para estes autores, a informação já conhecida aparece, normalmente, no início da frase e a informação nova tende a aparecer no seu fim.

A crença de que a ordem natural da frase é Sujeito-Verbo-Objecto (SVO) provém de tempos antigos. Tal como o inglês, o português é uma língua SVO, ou seja, é essa a ordem linear esperada para as suas frases. No entanto, esta ordem não se verifica sempre.

Na sua análise comparativa entre as duas línguas, Maia constatou que os textos ingleses mantinham, na sua maioria, a ordem Sujeito-Predicado. Com efeito, 88% das frases seguiam esta ordem, independentemente do facto de o sujeito ser ou não o tema da frase. Já nas frases portuguesas, isto apenas ocorria em 51,1% dos casos. Outra constatação foi a de que em 64% das frases inglesas o sujeito constituía o tema, o que se verificava apenas em 31,85% das frases portuguesas. Ainda outra diferença observada foi o facto de, em inglês, ser raro o verbo ser o primeiro constituinte da frase, à excepção das frases imperativas e das “Yes/No questions”. Já em português, o verbo surge na posição de tema em 19,2% de todas as frases consideradas.

Desta análise ficaram patentes outras características do português, relacionadas com o uso do verbo:

➤ a língua portuguesa não exige que se use um nome ou pronome junto ao verbo, excepto “for disambiguation or emphasis so, if the topic has been introduced earlier the verb occurs naturally on its own, often in theme position.” (Maia, 1996: 9);

➤ também a construção verbo + pronome reflexo –se pode ter a função de tema, sem que seja forçoso existir um sujeito explícito. Isto ocorre, frequentemente, em expressões como “Sabe-se” e “It is known”, em que se use um sujeito nulo indeterminado, equivalendo o –se ao *It*;

➤ o verbo precede o sujeito em muitas frases, especialmente quando se lida com um sujeito longo e complexo.

Estes mecanismos sintácticos são de grande utilidade, ajudando a evitar a construção de frases demasiadamente densas. No entanto, levantam alguns problemas aquando da sua tradução para o inglês.

Esta tematização do verbo indica a intenção recorrente dos falantes portugueses de atribuir maior ênfase inicial à acção do que ao agente dessa acção.

Logo da contracapa do manual traduzido podemos extrair um exemplo para ilustrar o facto de que a omissão do sujeito é habitual em português, concorrendo para a coesão textual, pois ele subentende-se. Estamos então na presença de um sujeito nulo subentendido, o que permite a não utilização de pronome antes do verbo. Este facto, aliado à simplificação do discurso, através da supressão da expressão figurativa, permitiu até, mais uma vez, o feito inusitado de reduzir a extensão da frase ao transpô-la para o português.

Texto de partida:

“Merck Darmstadt · Germany is a global pharmaceutical and chemical enterprise with roots dating back to 1668. Merck manages its operating activities under the umbrella of Merck KGaA, which is listed on the Frankfurt Stock Exchange.”

Tradução:

“A Merck Darmstadt - Alemanha é uma empresa farmacêutica e química global cujas origens remontam a 1668. Faz parte do grupo Merck KGaA, que está cotado na bolsa de Frankfurt.” (pág. 2)

Mesmo ao descrever os procedimentos de teste e tendo em consideração que estes devem estar claros, foi possível omitir o sujeito, sem que isso compromettesse a transparência do discurso. Disso é exemplo o seguinte extracto, retirado da página 32.

Texto de partida:

“All quick release aspirin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes.”

Tradução:

“Todos os comprimidos e cápsulas devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos.”

A construção verbo + pronome reflexo –se foi frequentemente utilizada, sobretudo na transposição da voz passiva para a activa, que foi uma constante ao longo da tradução, como se ilustra a seguir.

Texto de partida:

“Even pens and pencils are included. If needed, a digital pocket balance can easily be added.”

Tradução:

“Incluíram-se até canetas e lápis. Se for necessário, pode facilmente acrescentar-se uma balança digital de bolso.” (pág. 6)

O conjunto seguinte ilustra a inclusão na frase do verbo antes do sujeito, em português, contrariamente à frase inglesa, como se torna visível na página 5.

Texto de partida:

“Africa, parts of Asia, and parts of Latin America have areas where more than 30% of the medicines on sale can be counterfeit.”

Tradução:

“Existem áreas em África, em partes da Ásia e em partes da América Latina onde mais de 30% dos medicamentos comercializados podem ser falsificações.”

Procedeu-se a esta alteração porque a frase tem assim mais sentido em português do que se se mantivesse a personificação constante da frase inglesa. Em português o verbo “existir” obedece a regras muito especiais, tem uma construção mais agramatical; no entanto, este caso foi escolhido pois ilustra perfeitamente a existência de um sujeito pós-verbal. Foi ainda feita outra alteração, traduzindo “counterfeit” por falsificações, passando de um particípio passado para um nome, por motivos de desambiguação. Com efeito, se se tivesse usado “falsificados” tal poderia ser interpretado no sentido de ser possível falsificar medicamentos nestas áreas, e não de alguns medicamentos lá comercializados terem sido falsificados.

Ainda outros elementos, como advérbios e complementos circunstanciais, elementos não essenciais para o estabelecimento da existência de uma frase, surgem, muito mais frequentemente em português do que em inglês, a desempenhar o papel de tema.

“One cannot simply oblige the information supplying conventions of one language to obey those of another without changing the message. The thematising of Adjuncts in Portuguese may have a deeper psychological function of needing to establish the circumstances before discussing the action.” (Maia, 1996: 11)

Maia chama a atenção para esta necessidade de o tradutor descodificar correctamente a mensagem e identificar a intenção comunicativa do autor do enunciado, para assim o poder transpor correctamente para a língua de chegada. Não é suficiente dominar os dispositivos sintácticos das duas línguas, sob pena de alterar o teor da mensagem.

No exemplo seguinte, constante da página 25, alterou-se a ordem dos constituintes da frase, criando um complemento de fim, que se passou para o fim da frase, separado por uma vírgula, pois considerou-se que a descrição do modo de proceder deveria estar junto ao verbo, ao passo que na frase inglesa encontrávamos dois “adjuncts” ou, neste caso, duas locuções adverbiais, dispostas na ordem inversa – primeiro a de fim e depois a de modo.

Texto de partida:

“Mark them for further evaluation using the pencil supplied.”

Tradução:

“Marque-as com o lápis fornecido, para futura avaliação.” (pág. 30)

Texto de partida:

“For further disposal, follow local rules.”

Tradução:

“Siga as regras locais quanto ao tratamento ou eliminação desses contentores.”
(pág. 30)

Nestes casos considerou-se, ao transpor para o português, exactamente como refere Maia, que se deveria enunciar, primeiramente, as circunstâncias, neste caso as normas, e, seguidamente a acção a efectuar.

“In languages with elaborate case inflexions, word order is largely a matter of stylistic variation and is available as a resource to signal emphasis and contrast and to organize messages in a variety of ways.” (Baker, 1992: 110)

Embora estes dois exemplos apresentados evidenciem uma mudança na ordem dos elementos das frases portuguesas, relativamente às frases inglesas correspondentes, elas não contêm um advérbio ou complemento adverbial no seu início. Já nos exemplos seguintes podemos registar, no primeiro caso, o uso da conjunção “como” para introduzir a situação e só depois a acção, expressa através de um presente do indicativo com sujeito indeterminado (“usa-se”). No segundo exemplo regista-se o uso da oração

subordinada condicional introduzida pela conjunção “se”, que, em inglês, é considerada um “adjunct”, no início da frase.

Texto de partida:

“A jar with a lid serves as developing tank.”

Tradução:

“Como contentor de revelação usa-se um frasco com tampa (de rosca).” (pág. 23)

Texto de partida:

“Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run.”

Tradução:

“Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote.” (pág. 35)

Relativamente às estruturas temáticas Mona Baker rege-se mais pela ideologia da Escola de Praga, embora refira sempre os pressupostos de Halliday, que analisa e contrapõe.

Aludindo à questão da marcação temática escreve: “Thematic choices involve selecting a clause element as theme. [...] The less expected a choice, the more marked it is”. (Baker, 1992: 129-130)

A estrutura sujeito-verbo-objecto é a usual para frases declarativas, cujo sujeito surge como tema não marcado, pois a sua posição na frase não representa uma escolha intencional. Em frases imperativas, como é o caso de grande parte das que constam do TP, surge-nos o verbo na posição inicial, indicando-nos o carácter prescritivo das mesmas.

“[...] in the case of an imperative clause, [...] the verb naturally occupies thematic position because that is what the message is about: getting the addressee to do something.” (Baker, 1992: 130-131)

Tal pode ser verificado no exemplo seguinte, retirado da página trinta e três do manual traduzido.

Texto de partida:

“Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial.”

Tradução:

“Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o.”

Deste exemplo pode ver-se que a estrutura frásica segue uma ordem equivalente, nas duas línguas, regida pelo uso do imperativo como forma verbal instrutiva. No entanto, houve a necessidade de proceder a algumas adaptações: para o verbo “pipette” sentiu-se a necessidade de se formular uma explicação, por motivos de clareza e para permitir ao utilizador do manual “visualizar” o procedimento que teria de executar, embora o verbo “pipetar” exista em português; na segunda frase, a alteração teve já em mente as normas sintácticas da língua de chegada, atribuindo um sujeito ao primeiro verbo da frase, substituindo-o por um pronome na segunda oração.

Refira-se ainda que o facto de o modo imperativo em inglês permitir a ausência de um sujeito é uma característica essencial para a sua distinção de outras estruturas sintácticas em registos escritos. Apenas em frases típicas de discursos orais é comum encontramos esta característica.

Em português a ausência do sujeito não é um facto tão notório, pois, como já vimos, isso ocorre frequentemente, em todo o tipo de frases, pois o verbo comporta já marcas de flexão, permitindo a omissão do sujeito.

Esta ausência do sujeito resulta da importância que a pessoa que deverá realizar a acção assume, nela se centra o foco do acto ilocutório.

Existe, no entanto, uma diferença entre as duas línguas no que respeita ao imperativo. Contrariamente ao que acontece no inglês, o imperativo português é muito restrito, pois não apresenta forma negativa, socorrendo-se, para tal, do conjuntivo, e, das duas formas afirmativas que possui, uma caiu já em desuso e a outra é bastante limitada, pois reduz-se ao tratamento por “tu”.

Já no inglês, a forma de tratamento “you” abrange todo o tipo de relação locutor-alocutário.

♦Implicações das diferenças entre as línguas para o processo tradutológico

“Risk, let us say, is the possibility of not fulfilling the translation’s purpose.” (Pym, 2010: 2)

A constatação da existência das diferenças entre estas duas línguas ao nível da estrutura frásica leva à reflexão quanto ao tipo de tradução a realizar. Deve o tradutor manter-se fiel à ordem de aparecimento dos elementos que, obviamente, não é acidental, mas está antes condicionado pelo resto do texto e pela ênfase que o autor quer dar a determinados pontos?

No nosso caso, esta ordem é de especial relevância, dado o carácter prescritivo dos manuais e a necessidade de encadear os elementos de forma a que a ordem correcta dos procedimentos esteja bem clara.

No entanto, dada a intenção bem vincada de explicitar o melhor possível todos os passos dos processos de teste e o seu encadeamento, utilizaram-se, por vezes, estratégias que implicaram a alteração dos elementos da frase.

“[...] translators into English have to ‘regularize’ the Verb-Subject order of Portuguese sentences, and produce pronouns or introduce Subjects where none exist in the original. [...] Translating from English into Portuguese presents fewer apparent problems in this respect, as the rules for word order are far less rigid, and the regularity of the English original can usually be reproduced quite literally in Portuguese. However, will it sound natural to the Portuguese reader if one always respects the original?” (Maia, 1996: 12)

De facto, a flexibilidade da estrutura sintáctica portuguesa permite ao tradutor manter a ordem original dos elementos da frase sem que isso implique a ocorrência de qualquer erro. No entanto, uma leitura mais atenta permite-lhe verificar se os elementos estão colocados na ordem mais usual para o público-alvo. Esta verificação foi realizada na fase da pós-tradução, de que trataremos mais à frente e permitiu, de facto, localizar, entre outras ocorrências, os elementos que, mantendo a ordem das frases do texto original, causavam

alguma estranheza em português, pelo que se alterou a ordem da tradução inicial. Transcreve-se um exemplo retirado da página 6.

Texto de partida:

“If needed, a digital pocket balance can easily be added.”

Tradução inicial:

“Se necessário, uma balança digital de bolso pode facilmente ser acrescentada.”

Posteriormente:

“Se for necessário, pode facilmente acrescentar-se uma balança digital de bolso.”

Na realidade, a reorganização dos elementos da frase opera transformações não só ao nível morfo-sintático mas também ao nível semântico, já que cada língua atribui importância diferente a cada elemento, tematiza, como já vimos, segmentos diferentes.

A frase “For a precise measurement on temperature, an alcohol thermometer comes with the GPHF-Minilab.” (pág. 13), por exemplo, foi traduzida por: “O GPHF-Minilab traz um termómetro de álcool para que a medição da temperatura seja rigorosa.”. A frase passou a ter a ordem normal da sintaxe portuguesa, sujeito-verbo-objecto, passando o complemento circunstancial de fim (“adjunct of purpose”) do texto inglês a constituir a segunda oração no texto português, mencionando-se primeiro a circunstância que permite que essa situação final ocorra.

5.3 Fase de Pós-transferência

Após a transferência do texto de partida para a língua de chegada importa agora efectuar a verificação da correcção e adequação do texto obtido.

No nosso caso, em que estiveram três elementos a participar no projecto e, consequentemente, na tradução dos manuais, as reflexões e correcções foram sendo alvo de discussão entre os elementos do grupo de trabalho, para que se obtivesse um texto homogéneo, em que fosse usada sempre a mesma terminologia, o mesmo tipo de registo e o mesmo estilo linguístico, adequado não só à tipologia textual mas também ao público-alvo. No entanto, houve ainda lugar a uma verificação final, efectuada por mim e pela minha colega Inês Grilo, pois trabalhámos as duas na tradução do Manual II.

5.3.1 Revisão Linguística

“Information can come from source texts, co-texts, linguistic contexts, human clients, and a lot of common sense. [...] In all cases, the general principle should stand: in order to define success or failure conditions, we need more information than is in the text. It follows that translators do not really work on texts; they work on projects, understood as texts plus extensive contextual information, [...]” (Pym, 2010: 6)

O conhecimento do contexto da produção do texto de partida e também da futura utilização do texto de chegada nortearam não só a tradução do manual mas também a sua revisão.

Assim sendo, a revisão linguística pautou-se pela verificação da adequação do texto ao público-alvo, visando a explicitação dos conteúdos, a correcção das estruturas sintácticas, privilegiando frases simples, claras e curtas e o uso de vocabulário, tanto quanto possível, passível de ser facilmente apreendido, embora mantendo um registo cuidado, dado o cariz técnico e científico do texto com que trabalhámos.

Na página 25 do manual, por exemplo, encontramos a seguinte frase:

“A second battery driven ultra-violet lamp capable of radiating long waves of 366 nanometres for further detection of invisible spots.”

A falta de verbo nesta frase não se mostrou muito relevante na fase de tradução por esta ter sido levada a cabo com a presença do manual original, em que a frase acompanha a imagem da lanterna. Contudo, aquando da revisão, e tendo conhecimento de que o texto de chegada não seria impresso com as imagens, seria antes anexado ao texto original, mostrou-se imperativo restaurar a correcção sintáctica e incluir um verbo e ainda um advérbio que faz a ligação com o segmento anterior:

“Fornecemos, também, uma segunda lanterna com uma lâmpada ultravioleta capaz de irradiar ondas longas de 366 nanómetros, para detecção futura de manchas invisíveis.”

Uma das grandes preocupações e fonte de dúvidas relativamente à escolha do vocabulário foi a utilização de vocabulário acessível, na construção das frases, mas que não se incompatibilizasse com o vocabulário especializado e não compromettesse a adequação linguística ao domínio. Dado estarmos na presença de um texto em que é usado um discurso de especialidade mas que estará ao serviço de técnicos e países com formações diversas, por vezes formais e até não formais, impôs-se a adequação do vocabulário, tendo a preocupação não de simplificar o texto, alterando o seu registo, mas de não o complicar.

Por este motivo, algumas das alterações propostas pelo professor validador, Doutor Bruno Gago, no que diz respeito a vocabulário não especializado, mas que visava, segundo a sua óptica, elevar o tipo de discurso e moldá-lo, segundo critérios de adequação, a um público especializado e com uma formação formal elevada, motivaram o meu pedido de reunião. Esta reunião teve como propósito chegar a um consenso quanto à possibilidade de substituir alguns vocábulos e expressões por outros de maior distribuição, cuja probabilidade de serem reconhecidos por falantes e leitores de países em que o português é a segunda língua fosse maior.

Todas as alternativas que propus para aproximar o texto do público-alvo foram aceites, os validadores não se tinham apercebido dessa situação, de se desconhecer o grau de formação dos utilizadores e de o português não ser a

primeira língua de alguns, especialmente dos prestadores de cuidados médicos locais e até de voluntários de outros países.

Na página 16, por exemplo, deparamo-nos com esta frase:

“[...] it must displace the drug from the adsorbent [...]”

A tradução inicial foi:

“[...] tem de separar o fármaco do adsorvente [...]”

O validador propôs:

“[...] tem de deslocar o fármaco do adsorvente [...]”

Após a reunião acordámos em manter “separar” pois considerou-se que este vocábulo não alterava o sentido do que se pretendia transmitir e teria maior probabilidade de ser reconhecido pelo público-alvo.

Já na página 33 encontramos este excerto:

“Wrap up one reference tablet into aluminium foil [...]”

Ao uso da forma verbal “embrulhe” (“Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio [...]”), com que havíamos traduzido “Wrap up”, o validador contrapôs:

“Envolva um comprimido de referência em folha de alumínio [...]”

Ora o uso do verbo “embrulhar” era, segundo o nosso parecer, mais ilustrativo do procedimento a executar, pelo que se havia optado pela tradução literal, com a qual o validador acabou por concordar.

Refira-se ainda que a dificuldade que por vezes sentimos em perceber determinadas frases e procedimentos no texto original foi também partilhada pelos validadores. Consideramos que esta situação deve ser motivada pelo facto de o texto ter sido elaborado por vários autores, oriundos de vários países cuja língua oficial não é o inglês.

5.3.2 Revisão Científica

O revisor científico apontou as incorrecções ao nível do vocabulário específico, científico e técnico. Muitas delas eram resultado da falta da total percepção dos procedimentos a executar, já que nos situamos aqui num conjunto de domínios extremamente especializados. Estes procedimentos foram então explicitados para assim se proceder, de forma consciente, às alterações.

Casos houve em que as alterações se prendiam com o domínio de termos e procedimentos de cariz técnico, como nos exemplos seguintes, retirados da página 33.

Texto de partida:

“PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION”

Tradução inicial:

“PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO”

Tradução final:

“PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO”

Foi-nos explicado que a solução se designa assim porque se obtém através do padrão. Apenas conseguimos aceder a este conhecimento através da explicação do validador.

Também no exemplo seguinte se verifica que, apesar de todas as pesquisas efectuadas, apenas com as explicações do validador nos foi possível aceder ao conhecimento que nos permitiu tornar a tradução mais exacta e fiel ao texto de partida.

Texto de partida:

“PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)”

Tradução inicial:

“PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (LIMITE SUPERIOR DE EFICÁCIA)”

Tradução final:

“PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)”

Na reunião com o validador conseguimos perceber que esta designação se justifica por nos estarmos a referir à concentração limite com que se consegue trabalhar, efectuar os testes.

Mas houve outras alterações que tiveram em conta o contexto em que estes procedimentos vão ter lugar, a falta de condições ideais. Ainda na mesma página encontramos um exemplo desta situação.

Texto de partida:

“The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml [...]”

Tradução inicial:

“A solução obtida deve conter 2,5 mg de fármaco na forma pura por ml [...]”

Tradução final:

“A solução obtida deve conter 2,5 mg de fármaco por ml [...]”

A não inclusão de “na forma pura” deveu-se ao conhecimento de que os utilizadores do manual não terão as condições ideais de laboratório para realizar os testes e que, portanto, é impossível obter uma quantidade de uma substância na forma pura, sem qualquer contaminação de outra substância, até porque os testes são realizados extraindo as substâncias de medicamentos, que contêm várias outras substâncias.

6.Fase de Pós-tradução

Nesta fase procedeu-se às correcções, de acordo com a revisão científica mas também ao nível ortográfico e estrutural, revisitando o texto de chegada como um produto autónomo.

Foi também necessário verificar a formatação, tendo-se mantido o documento no formato Word, sem imagens, para ser apresentado em conjunto com o texto original, também no mesmo formato. O esforço maior, ao nível da formatação, havia já sido dispendido na fase de preparação do documento para ser trabalhado, pois só assim foi possível usar o *software MemoQ*.

7. Notas Conclusivas

Este projecto permitiu pôr em prática conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado, não só a nível teórico, mas também relativamente ao uso de tecnologias aplicadas na tradução e de metodologias de trabalho de projecto. Devo referir que o domínio destas tecnologias foi o meu grande objectivo quando decidi alterar o rumo da minha vida profissional, após dezassete anos dedicados ao ensino, e candidatar-me ao mestrado, para posteriormente estar habilitada a seguir a carreira de tradutora.

Uma das noções que os nossos professores procuram inculcar em nós foi a de efectuar uma preparação, previamente à realização da tradução. Esta preparação envolve uma primeira leitura do texto de partida, a tipificação desse texto, disponibilização de material e pesquisas. Esta organização do trabalho do tradutor por etapas, com vista à optimização do processo de tradução, constituiu uma novidade para mim que, nas poucas traduções que já efectuara anteriormente a este reingresso no Departamento de Línguas e Culturas, tinha mergulhado imediatamente na transferência do texto de chegada, fazendo as necessárias pesquisas durante o processo.

Entendo agora que “[...] risks are reduced by foresight. Planning is good.” (Pym, 2010: 6). Mas o trabalho do tradutor não se limita às pesquisas e à tradução, motivo pelo qual lançámos mão do método de Gouadec e da Teoria Skopos de Vermeer para nos orientarmos e organizarmos to o processo.

As pesquisas prévias efectuadas são decisivas para a boa consecução do trabalho de tradução mas não constituem o único “trunfo” para que se obtenha um trabalho de qualidade: “There must still be room for experience, pragmatism, justified non-translation, creativity and inspiration [...]”. (Pym, 2010: 7) Os conhecimentos linguísticos e a capacidade de “moldar” o texto de acordo com o seu propósito, a sua função e também de modo a que este vá ao encontro das características e expectativas do público-alvo desempenham um papel fulcral.

Para além da preocupação em harmonizar os textos de chegada dos três elementos que trabalharam neste projecto, procurou-se ainda respeitar os critérios de coerência e coesão.

Daí que se tenham consultado outros manuais, textos de farmacologia, bulas de medicamentos e até se tenham inquirido vários enfermeiros e médicos para nos certificarmos do vocabulário e estruturas frásicas e textuais comumente usados não só neste tipo de documento mas também pelo grupo de profissionais que fornece alguns dos voluntários a trabalhar nestes países. Embora não tendo certezas quanto à formação dos utilizadores do Minilab, pareceu-nos que seria pertinente consultá-los e adequar o vocabulário, expressões e estruturas segundo aqueles a que estão habituados e mais facilmente reconhecem já que, a formação dada no terreno a utilizadores leigos será, provavelmente, ministrada por pessoas deste grupo.

O próprio texto de partida segue as normas de produção de um manual de instruções e apenas foi necessário especificar algumas indicações temporais ou acrescentar informação para “ilustrar” melhor o procedimento a efectuar.

Para a coesão do texto contribuiu o encadeamento cronológico das instruções, a indicação do seu propósito e o facto de se seguir a mesma estrutura para todas as substâncias activas.

Refira-se que a tradução do manual levantou um problema quanto à ordem dos fármacos, pois no texto de chegada estes já não surgem segundo a ordem alfabética correcta. No entanto, considerámos que, uma vez que este texto será anexado ao texto de partida, este facto não deverá causar entraves à utilização rápida e eficiente do manual.

As questões terminológicas, nomeadamente as que foram objecto de saudável e proveitosa discussão com o validador, deram azo a que nos fossem explicados os processos de teste referidos nos manuais, para permitir a total percepção desses processos e, consequentemente, a adequação do vocabulário e expressões para os descrever.

Ao efectuar este trabalho de reflexão acerca da nossa participação neste projecto procurámos, para além da descrição das diferentes etapas seguidas, apresentar as alterações a que julgámos oportuno proceder, aquando da transferência do texto inglês para português.

Dividimos estas alterações segundo as razões que as motivaram: pragmatismo, estilo e sintaxe.

Desde logo se estabeleceu como linha orientadora para este projecto de tradução a procura da clarificação dos conteúdos, a utilização de um discurso que, apesar de especializado, não se tornasse um obstáculo à utilização dos manuais. Daí as transformações de cariz pragmático.

A transposição de uma mensagem de uma língua para outra levou também a alterações com o objectivo de que o discurso fluísse de uma forma mais natural, de acordo com o que o leitor esperaria encontrar num texto desta natureza.

A perspectiva sintáctica foi aquela em que nos centrámos mais aturadamente. Este estudo comparativo revelou-se extremamente proveitoso, uma vez que o dissecar das frases nas duas línguas despoletou a necessidade de conhecer e classificar os seus componentes, levando a um aturado estudo linguístico que proporcionou não só a consolidação de conhecimentos nesta área, como a aquisição de muitos outros. Nesta fase socorremo-nos, sobretudo, de um estudo de Maia, mas procurámos aprofundar e adaptar as suas conclusões ao texto com que trabalhamos, com características próprias e fundamentar as alterações efectuadas durante o processo de tradução.

Face ao trabalho realizado, reiteramos a posição com que o acolhemos, de total agrado pelo facto de este originar um produto que será extremamente útil e que será utilizado para ajudar a salvar vidas humanas.

Também o esforço realizado para resolver os problemas de tradução e adaptar a mensagem do texto de partida à língua-cultura portuguesa, a reflexão linguística e a análise sintáctica comparativas do texto de chegada e

do texto de partida, resultaram num maior conhecimento das duas línguas. Consideramos, assim, que o texto de chegada deixará transparecer todas estas diligências efectuadas durante a sua produção e executará a função a que se destina, permitindo aos seus utilizadores aceder facilmente ao seu conteúdo.

8. Bibliografia

BAKER, Mona (1992), *In Other Words: A Coursebook on Translation*. Londres, Routledge.

BASSNET, Susan (2008), *Translation Studies*. Londres, Routledge

BYRNE, Jody (2006), *Technical Translation: Usability Strategies for Translating Technical Documentation*. Dordrecht, Springer

CASANOVA, Isabel (2006), *Linguística Contrastiva. O Ensino da Língua Inglesa*. Lisboa, Universidade Católica

COUTURE, Barbara (1986). "Effective ideation in written text: a functional approach to clarity and exigence." In B. Couture ed., *Functional Approaches to Writing Research Perspectives*. Londres, Frances Pinter.

GOUADEC, Daniel (2007), *Translation as a Profession*. Amesterdão-Filadélfia: John Benjamins Publishing Company.

HALLIDAY, Michael, HASAN, Ruqaiya (1993), *Cohesion in English*. Londres, Longman

HATIM, Basil, MASON, Ian (1990), *Discourse and the Translator*. Londres, Longman.

MUNDAY, Jeremy (2001), *Introducing Translation Studies, Theories and Applications*. Londres, Routledge.

NORD, Christiane (2005), *Text Analysis in Translation. Theory, Methodology, and Didactic Application of a Model for Translation-Oriented Text Analysis*. Amesterdão-Nova Iorque, Rodopi.

NORD, Christiane (2007), *Translating as a Purposeful Activity. Functionalist Approaches Explained*. Manchester, St. Jerome Publishing.

PYM, Anthony (2010), *Exploring Translation Theories*. Londres, Routledge.

TROSBOR, Anna (1997), "Text Typology: Register, Genre and Text Type". In *Text Typology and Translation*: pp. 3-23. (ed: Anna Trosborg). Amesterdão, John Benjamins

VERMEER, Hans J. (2000). *Skopos and commission in translational action*. A. Chesterman (trans.). In VENUTI, Lawrence ed., *The Translation Studies Reader*. London: Routledge, pp. 221-233.

9. Webgrafia

ABDELLAH, Antar (2005), "What Every Novice Translator Should Know", ProZ.com Translation Article Knowledgebase
<http://www.proz.com/translation-articles/articles/299/1/What-Every-Novice-Translator-Should-Know>
(consultado a 30-05-2011)

GPHF - Minilab
<http://www.gphf.org/web/en/minilab/index.htm>
(consultado a 10-01-2011)

HODGES, Peter (2009), Linguistic Approach to Translation Theory.
<http://www.translationdirectory.com/articles/article2019.php>
(consultado a 01-06-2011)

KIES, Daniel (1995), Grammar: Words and Their Arrangement, Form and Function of the English Clause.
<http://papyr.com/hypertextbooks/grammar/clause.htm>
(consultado a 12-04-2011)

LEONARDI, Vanessa (2000), "Equivalence in Translation: Between Myth and Reality", Translation Journal, Volume 4
<http://translationjournal.net/journal/14equiv.htm>
(consultado a 03-05-2011)

MAIA, Belinda (1999), Natural sentence structure in English and Portuguese and its influence on the organisation of information in the process of translation. Porto, Universidade do Porto. Faculdade de Letras
<http://hdl.handle.net/10216/35746>
(consultado a 03-03-2011)

MAIA, Belinda (1996), "The sentence as a Unit of Translation", Jornadas de Tradução do ISAI, Artigo em Livro de Actas de Conferência Nacional. Universidade do Porto
<http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/14032/2/sentence000072821.pdf>
(consultado a 03-03-2011)

MAIA, Belinda (1998), "Word Order and the First Person Singular in Portuguese and English", Meta : journal des traducteurs / Meta: Translators' Journal, vol. 43, nº 4
<http://id.erudit.org/iderudit/003539ar>
(consultado a 13-04-2011)

MORAIS, Maria da Felicidade (1998), Análise Temática, Contributos para o estudo das diferenças textuais tipológicas. Dissertação de Mestrado em Linguística Geral apresentada à Faculdade de Letras da Universidade de Coimbra

http://www1.ci.uc.pt/celga/membros/docs/mfam/1998_mfmorais_mestrado.pdf
(consultado a 18-05-2011)

NORD, Christiane (2006), “Loyalty and Fidelity in Specialized Translation”, *Confluências-Revista de Tradução Científica e Técnica*, n.º 4, pp. 29-40

<http://www.confluencias.net/n4/nord.pdf>
(consultado a 19-03-2011)

ORDUDARI, Mahmoud (2008), “Good Translation: Art, Craft, or Science?”, *Translation Journal*, vol.12, nº1.

accurapid.com/journal/43theory.htm
(consultado a 24-11-2010)

PEREIRA, Rui (2009), O Conceito de Texto: Unidade Supra-frásica.

www.esgportugues.com/docspdf/grtexto.pdf
(consultado a 08-05-2011)

PYM, Anthony (2010), Text and risk in translation. Intercultural Studies Group. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, Spain

http://www.tinet.cat/~apym/on-line/translation/risk_analysis.pdf
(consultado a 05-04-2011)

PYM, Anthony (2010), Translation Theory as Historical Problem-Solving

<http://usuaris.tinet.cat/apym/on-line/translation/translation.html>
(consultado a 05-04-2011)

SANTOS, Diana (2007), “A tradução na sociedade do conhecimento OU Tradução: uma tecnologia humana de ponta OU Ciência e Tradução”, In *Actas do IX Seminário de Tradução Científica e Técnica em Língua Portuguesa 2007*, Lisboa: União Latina.

<http://comum.rcaap.pt/handle/123456789/98>
(consultado a 28-04-2011)

ZEQUAN, Liu (2003), “Register Analysis as a Tool for Translation Quality Assessment”, *Translation Journal*, volume 7, nº 3

<http://translationjournal.net/journal/25register.htm>
(consultado a 12-09-2011)

10. Glossários, enciclopédias, gramáticas, conversores, legislação

Amway – Glossário

http://www.amway.pt/cms/new_brand_center/new_BC_espring/glossary

(consultado a 15-03-2011)

Basic English Syntax with Exercises

<http://primus.arts.u-szeged.hu/bese/Glossary/gloss.htm>

(consultado a 11-04-2011)

Concise Oxford Companion to the English Language

<http://www.encyclopedia.com/doc/1O29-ADVERBIAL.html>

(consultado a 11-04-2011)

E-Dicionário de Termos Literários

http://www.fcsh.unl.pt/invest/edtl/verbetes/C/coerencia_coesao.htm

(consultado a 10-05-2011)

English Grammar

<http://www.englishlanguageguide.com/english/grammar/adjunct.asp>

(consultado a 12-04-2011)

Folhetos de Medicamentos

<http://www.folheto.net/category/amoxicilina-amoxicilina-e-inibidor-da-enzima/>

(consultado a 22-01-2011)

Free OCR – conversor

<http://www.free-ocr.com/>

(consultado a 24-01-2011)

General English Grammar

<http://www.englishforums.com/English/AdjunctsFunctionalGrammarHallidayan-Approach/xhvx/post.htm#71043>

(consultado a 11-04-2011)

Glossary of English Grammar Terms

<http://www.usingenglish.com/glossary.html>

(consultado a 01-06-2011)

IATE , Interactive Terminology for Europe

<http://iate.europa.eu/iatediff/SearchByQueryLoad.do;jsessionid=9ea7991930d6f56d9c798c34a82b3408bb0c99d2247.e38KbN4MchyMb40SbxyRaN0LbN50?method=load>

(consultado a 10-01-2011)

INFARMED – legislação

http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/LEGISLACAO/LEGISLACAO_FARMACEUTICA_COMPILADA

(consultado a 27-02-2011)

INFARMED – medicamentos manipulados

http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/INSPECCAO/MEDICAMENTOS_MANIPULADOS

(consultado a 15-03-2011)

INFARMED – VADEMECUM

<http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/VADEMECUM>

(consultado a 10-01-2011)

Infopédia

<http://www.infopedia.pt/>

(consultado a 10-01-2011)

Manual Merck

<http://www.manualmerck.net/?id=31>

(consultado a 10-01-2011)

Medical Dictionary

<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/>

(consultado a 10-01-2011)

Médicos de Portugal – Glossário Médico

<http://medicosdeportugal.saude.sapo.pt/glossario>

(consultado a 10-01-2011)

Medipédia

<http://www.medipedia.pt/home/home.php?module=enciclopedia>

(consultado a 15-03-2011)

Merriam-Webster Dictionary

<http://www.merriam-webster.com/dictionary/adjunct>

(consultado a 12-04-2011)

Programa Prof2000

<http://www.prof2000.pt/users/anamartins/flup/lpe/aula8.html>

(consultado a 12-04-2011)

Systemic-Functional Grammar

<http://folk.uio.no/hhasselg/systemic/index.html>

(consultado a 18-04-2011)

The Free dictionary
<http://www.thefreedictionary.com/>
(consultado a 15-03-2011)

Anexo

Original e Tradução

A Concise Quality Control Guide on Essential Drugs and other
Medicines

Manual

Accompanying The GPHF - Minilab®

Volume II

THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC TESTS

GPHF

GLOBAL PHARMA
HEALTH FUND E.V.

A Charity Initiated and Sponsored by
Merck Darmstadt – Germany

Um Guia Conciso de Controlo de Qualidade de Fármacos Essenciais e outros
Medicamentos

Manual

Acompanha o GPHF-Minilab®

Volume II

CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA

GPHF

GLOBAL PHARMA
HEALTH FUND E.V.

Uma Instituição de Beneficência Iniciada e Patrocinada
pela Merck Darmstadt — Alemanha

A Concise Quality Control Guide on Essential Drugs and other Medicines

VOLUME II • THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC TESTS

Written by

Richard W. O. Jahnke

Contributions by

Peter Pachaly, Peter N. Gobina, Andreas Schuster, Oliver J. Nigge, Kornelia Dwornik, Volker Rubeau, Natalia Davydova, Sanford Bradby, Mustapha Hajjou, Abdelkrim Smine and Souly Phanouvong

Acknowledgements to

The United States Agency for International Development (USAID) for its financial support and the technical assistance

provided by the staff of The United States Pharmacopeia Drug Quality and Information program

Published by

Global Pharma Health Fund (GPHF)

A Charity Initiated and Sponsored by Merck Darmstadt • Germany

2008 Update

Copyright © by GPHF

About Merck Darmstadt Germany

Merck Darmstadt • Germany is a global pharmaceutical and chemical enterprise with roots dating back to 1668. Merck manages its operating activities under the umbrella of

Merck KGaA, which is listed on the Frankfurt Stock Exchange. Today, around 30% percent of the company's share capital is publicly traded, while the Merck family owns an interest of about 70%. Merck is pursuing a strategy of operating in two major business sectors — Pharmaceuticals and Chemicals.

The Pharmaceuticals business comprises branded prescription drugs, e.g. for the treatment of cancer, neurological and growth disorders, cardiovascular diseases and infertility. The product range of this business sector also includes a wide range of well-known brands for consumer health care.

The Chemicals business sector offers chemicals for sophisticated applications: liquid crystals for displays, effect pigments for industry and cosmetics, analytical reagents and test kits, as well as products and services along the entire process chain of the pharmaceutical and biotech industry.

In 2007, Merck Darmstadt • Germany and the World Health Organization (WHO) in Geneva signed a partnership agreement to control schistosomiasis in African schoolchildren. Under this agreement, Merck will donate 200 million praziquantel 600 mg tablets (Cesol 600®) - a sufficient quantity to treat about 27 million children in the next ten years. This initiative came together with the establishment of the Global Pharma Health Fund (GPHF) in Frankfurt, a charity exclusively sponsored by Merck and driven to improve health and medicines supply in developing countries. The GPHF-Minilab acts as first-line defence against counterfeit and substandard medicines threatening the health of millions of people in developing countries.

Made by Grimm Grafik Design

GPHF-Minilab assembled and supplied by Technologie Transfer Marburg, Cölbe, Germany

Um Guia Conciso de Controlo de Qualidade de Fármacos Essenciais e outros Medicamentos

VOLUME II • CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA

Autor

Richard W. O. Jähnke

Colaborações

Peter Pachaly, Peter N. Gobina, Andreas Schuster, Oliver J. Nigge, Kornelia Dwornik, Volker Rubeau, Natalia Davydova, Sanford Bradby, Mustapha Hajjou, Abdelkrim Smine and Souly Phanouvong

Agradecimentos

À Agência Norte Americana para o Desenvolvimento Internacional (USAID) pelo seu apoio financeiro e ao Programa para a Qualidade e Informação acerca dos Medicamentos da Farmacopeia Norte Americana, pela assistência técnica disponibilizada.

Edição

Global Pharma Health Fund (GPHF)

Uma Instituição de Beneficência Iniciada e Patrocinada pela Merck Darmstadt – Alemanha

Versão actualizada em 2008

Direitos reservados por: GPHF

A Merck Darmstadt - Alemanha

A Merck Darmstadt · Alemanha é uma empresa farmacêutica e química global, cujas origens remontam a 1668. Faz parte do grupo Merck KGaA, que está cotado na bolsa de Frankfurt. Actualmente, cerca de 30% do capital social da empresa está no mercado accionista, pertencendo os restantes 70% ao grupo Merck. A Merck definiu como estratégia operar em dois grandes sectores de negócio - o farmacêutico e o químico.

A divisão farmacêutica abrange medicamentos de prescrição médica, da própria marca, para o tratamento do cancro, problemas neurológicos e de crescimento, doenças cardiovasculares e a infertilidade, por exemplo. Este sector de negócio abrange ainda uma vasta gama de produtos de marcas bem conhecidas, de venda livre, para cuidados de saúde.

A divisão de químicos oferece produtos químicos para aplicações especializadas: cristais líquidos para monitores, pigmentos de efeito para a indústria e a cosmética, reagentes analíticos e kits de testes, assim como produtos e serviços para toda a actividade da indústria farmacêutica e biotecnológica.

Em 2007 a Merck Darmstadt · Alemanha e a Organização Mundial de Saúde (OMS), sediada em Genebra, assinaram um protocolo de cooperação com vista ao controlo da schistosomíase nas crianças africanas. Segundo este acordo, a Merck irá doar 200 milhões de comprimidos de 600 mg de praziquantel (Cesol 600®) - quantidade suficiente para tratar cerca de 27 milhões de crianças nos próximos dez anos. Esta iniciativa coincidiu com a formação do Global Pharma Health Fund (GPHF), em Frankfurt, uma instituição de beneficência patrocinada exclusivamente pela Merck, cujo objectivo é melhorar a saúde e o fornecimento de medicamentos nos países em desenvolvimento. O GPHF-Minilab funciona como primeira linha defensiva contra os medicamentos falsificados e os de baixa qualidade, que constituem uma ameaça para a saúde de milhões de pessoas nos países em desenvolvimento.

Composição e impressão: Grimm Grafik Design

O GPHF-Minilab® é produzido e fornecido pela Technologie Transfer Marburg, Cölbe, Alemanha
--

Table of Contents

Chapter	Page
1 Introduction	5
2 Health & Safety.....	9
3 Visual Inspection	10
4 Disintegration Testing	13
5 Thin Layer Chromatographic Testing	14
5.1 How does a TLC system work?.....	14
5.2 Stationary phase	15
5.3 Mobile phase.....	16
5.4 Sample preparation.....	17
5.5 Sample application	21
5.6 Chromatoplate development	23
5.7 Sample detection	24
5.8 Chromatoplate reading.....	27
5.9 Relative retention factor.....	28
5.10 TLC handling and sample errors.....	29
5.11 Cleaning and disposal	30
6 Individual Test Procedures	31
6.1 Acetylsalicylic Acid (Aspirin)	32
6.2 Aminophylline	36
6.3 Amodiaquine (as free base and hydrochloride)	40
6.4 Amoxicillin	44
6.5 Ampicillin.....	48
6.6 Artemether*	52
6.7 Artesunate.....	56
6.8 Cephalexin	60
6.9 Chloramphenicol	64
6.10 Chloroquine (as phosphate and sulphate)	68
6.11 Ciprofloxacin.....	72
6.12 Cloxacillin.....	76
6.13 Didanosine	80
6.14 Erythromycin (as free base and stearate).....	84
6.15 Ethambutol*	88
6.16 Furosemide	92
6.17 Glibenclamide.....	96
6.18 Griseofulvin.....	100
6.19 Indinavir	104
6.20 Isoniazid*.....	108
6.21 Lamivudine*	112
6.22 Lumefantrine*.....	116
6.23 Mebendazole.....	120
6.24 Mefloquine	124
6.25 Metronidazole	128
6.26 Nevirapine.....	132
6.27 Oseltamivir.....	136

Table of Contents continued next page

Índice

Capítulo	Página
1 Introdução	5
2 Saúde e Segurança	9
3 Inspeção Visual	10
4 Teste de Desagregação	13
5 Cromatografia em Camada Fina	14
5.1 Como funciona um sistema de CCF?	14
5.2 Fase estacionária	15
5.3 Fase móvel	16
5.4 Preparação das amostras	17
5.5 Aplicação das amostras	21
5.6 Revelação da placa cromatográfica	23
5.7 Detecção das amostras	24
5.8 Leitura da placa cromatográfica	27
5.9 Factor de retenção relativa	28
5.10 Execução das CCF e erros das amostras	29
5.11 Limpeza e eliminação	30
6 Procedimentos para Testes Individuais	31
6.1 Ácido Acetilsalicílico (Aspirina)	32
6.2 Aminofilina	36
6.3 Amodiaquina (como base livre e cloridrato)	40
6.4 Amoxicilina	44
6.5 Ampicilina	48
6.6 Arteméter*	52
6.7 Artesunato	56
6.8 Cefalexina	60
6.9 Cloranfenicol	64
6.10 Cloroquina (como fosfato e sulfato)	68
6.11 Ciprofloxacina	72
6.12 Cloxacilina	76
6.13 Didanosina	80
6.14 Eritromicina (como base livre e estearato)	84
6.15 Etambutol	88
6.16 Furosemida	92
6.17 Glibenclamida	96
6.18 Griseofulvina	100
6.19 Indinavir	104
6.20 Isoniazida*	108
6.21 Lamivudina*	112
6.22 Lumefantrina*	116
6.23 Mebendazol	120
6.24 Mefloquina	124
6.25 Metronidazol	128
6.26 Nevirapina	132
6.27 Oseltamivir	136

O índice continua na página seguinte

6.28 Paracetamol (Acetaminophen).....	140
6.29 Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V)	144
6.30 Praziquantel	148
6.31 Prednisolone	152
6.32 Primaquine (as diphosphate)	156
6.33 Pyrazinamide*.....	160
6.34 Quinine (including common salt forms)	164
6.35 Rifampicin*	168
6.36 Salbutamol	172
6.37 Stavudine*	176
6.38 Sulfadoxine (including SP formulations)	180
6.39 Sulfamethoxazole (including cotrimoxazol formulations)	184
6.40 Tetracycline	188
6.41 Zidovudine*	192
7 Summary Table of TLC Test Procedures	196
8 Sampling Procedures	199
9 Reporting Forms	201
10 List of Inventory Items for Minilab TLC Test Kit	205
11 Assembly Illustration for Minilab TLC Test Kit	208

* including fixed-dose combination products

6.28 Paracetamol (Acetaminofeno)	140
6.29 Fenoximetilpenicilina (Penicilina V)	144
6.30 Praziquantel	148
6.31 Prednisolona	152
6.32 Primaquina (como difosfato)	156
6.33 Pirazinamida*	160
6.34 Quinina (nos diversos sais comuns)	164
6.35 Rifampicina*	168
6.36 Salbutamol	172
6.37 Estavudina	176
6.38 Sulfadoxina (incluindo formulações com pirimetamina)	180
6.39 Sulfametoxazol (incluindo as formulações com cotrimoxazol)	184
6.40 Tetraciclina	188
6.41 Zidovudina*	192
7 Tabela com o Resumo dos Procedimentos de Teste por CCF	196
8 Procedimentos de Recolha de Amostras	199
9 Formulários para Relatório	201
10 Lista de Itens de Inventário do Minilab TLC Test Kit	205
11 Manual da Montagem do Minilab TLC Test Kit	208

*incluindo produtos com combinações de doses fixas

1 Introduction

The incidence of counterfeiting pharmaceutical products and the proliferation of substandard quality medicines has been well identified internationally and constitutes serious health hazards. It is primarily flourishing in developing countries where institutional capacity in regulation, inspection and law enforcement is weak and adequate funds for regular drug quality monitoring are missing. Counterfeiting of pharmaceutical products can take all kinds of form, but the end result is, when administered to a patient, that the consequences range from treatment failure, increased toxicity, increased drug resistance to malaria, TB and AIDS, and even outright death as a result of any of the above.

It is reasonable to estimate that the prevalence of counterfeit medicines ranges from less than 1 percent of sales in developed countries, to over 10 percent in developing countries, depending on the geographical area. Africa, parts of Asia, and parts of Latin America have areas where more than 30% of the medicines on sale can be counterfeit. Other developing markets, however, have less than 10%; overall, a reasonable estimate is between 10% and 30%. Considering antimalarials, antibacterials and other anti-infective medicines, even one single case can be enough to put thousands of lives at risk. Completely ineffective counterfeit antimalarials containing no drug at all are flooding the markets in Southeast Asia already. The trust of patients into health care and medicines is gradually fading away.

Need for drug quality testing in low-income countries with non-comprehensive supply chains and counterfeit medicines proliferation			
Level	Location of testing	Scale of testing	Purpose of testing
1	Health post, rural retail outlets, consumers etc	Visual screening: inspection of dosage forms, labeling and packaging	Counterfeit medicines detection before consumption
2	Hospital, medical stores, priority disease programmes, wholesalers, importers, etc.	Basic testing: Colour reactions, thin-layer chromatography, disintegration	Post marketing surveillance, bridging capacity gaps when fully-fledged labs are not available, not in working order etc.
3	Regional/national public laboratories, independent private laboratories, industry labs etc.	Complete testing: pharmacopeical and other legally accepted methods	Pre- and post-shipment inspections, forensic testing for court actions etc.

1 Introdução

A incidência da falsificação de produtos farmacêuticos e a proliferação de medicamentos de baixa qualidade estão já bem identificadas internacionalmente e constituem um perigo grave para a saúde. Acontecem, principalmente, nos países em vias de desenvolvimento, onde a capacidade das instituições para regulamentar, inspeccionar e fazer aplicar a lei é fraca e não existem fundos adequados para a monitorização regular da qualidade dos fármacos. A falsificação de produtos farmacêuticos pode tomar várias formas, mas o resultado final, quando estes medicamentos são dados a um doente, pode ter consequências que vão desde a ineficácia terapêutica, aumento de toxicidade, aumento de resistência terapêutica aos medicamentos para a malária, tuberculose (TB) e SIDA, ou até mesmo à morte imediata, como resultado de qualquer destas situações.

É razoável estimar-se que a prevalência de medicamentos falsificados vá de menos de 1 por cento nos países desenvolvidos a mais de 10 por cento nos países em vias de desenvolvimento, dependendo da área geográfica em que se situam. Existem áreas em África, em partes da Ásia e em partes da América Latina onde mais de 30% dos medicamentos comercializados podem ser falsificações. Porém, outros mercados em vias de desenvolvimento têm menos de 10%; em suma, uma estimativa razoável estará entre os 10% e os 30%. No caso dos medicamentos contra a malária, antibióticos e outros medicamentos anti-infecciosos, mesmo um único caso pode ser o suficiente para pôr milhares de vidas em risco. Medicamentos contra a malária falsificados completamente ineficazes, não contendo qualquer fármaco, estão já a inundar os mercados do Sudeste Asiático. A confiança dos doentes nos cuidados para a saúde e nos medicamentos está, gradualmente, a desvanecer.

Necessidade do controlo da qualidade dos medicamentos em países de baixo rendimento com cadeias de fornecimento não abrangentes e com a proliferação da falsificação de medicamentos

Nível	Local do controlo	Escala do controlo	Objectivo do controlo
1	Postos de saúde, pontos de venda pública rurais, consumidores etc	Rastreio visual: inspecção das formas de dosagem, da rotulagem e da embalagem	Detecção de medicamentos falsificados antes do seu consumo
2	Hospitais, pontos de venda médicos, programas de doenças prioritárias, retalhistas, importadores, etc.	Controlo básico: Testes colorimétricos, cromatografia em camada fina, desagregação	Fiscalização pós-venda, colmatando falhas quando os laboratórios profissionais não estão disponíveis, não estão operacionais etc.
3	Laboratórios públicos regionais/nacionais, laboratórios privados independentes, laboratórios da indústria etc.	Controlo completo: procedimentos gerais farmacopeicos e outros procedimentos gerais legalmente reconhecidos	Inspecções antes e depois de expedição dos produtos, exames forenses para acções judiciais etc.

GPHF-Minilab® Need

Owing to the widespread danger of counterfeit medicines, quality control in the distribution system of developing countries has acquired new dimensions today. If adherence to good pharmaceutical manufacture, distribution and trading practice cannot be assumed, a great number of samples have to be tested in order to maintain an appropriate assurance of drug quality. At the same time, however, pharmacopoeial analyses have become more and more expensive and only a few centres of excellence in some countries are currently available to perform them. The development and use of simple tests should therefore facilitate a balance between the need to increase the extend of drug testing on the one hand, and the need to contain costs on the other.

The Global Pharma Health Fund (GPHF), a charity initiated and maintained by Merck Darmstadt Germany, set out to develop and supply a portable, tropics-compatible and easy-to-use mini-laboratory that could verify the drug's identity and content and thus detect fake medicines by employing inexpensive analytical techniques. The GPHF-Minilab could close the capacity gap on drug quality testing in countries where the means for an effective drug quality-control system are not yet fully in place or where full testing is expensive, hardly accessible or time consuming.

The GPHF-Minilab will enable health facilities responsible for drug purchase, storage and distribution to protect themselves against the menace of dangerous trade in counterfeit medicines. Counterfeit case management is part of the job. Case reporting is entirely voluntary. Once informed, GPHF can point to counterfeit medicines but performs no own investigations. Once substandard quality medicine has been identified, some health care providers might decide not to pay the bill, some others might change the supplier in silent. Minilabs put people not into jail. However, they can trigger off further investigations and instantly protect patients against treatments with ineffective counterfeit medicines. And finally, the sheer likelihood that the crime might get detected even far a field in rural areas might send a warning signal to the smart persons behind the crime and cut down the proliferation in counterfeit medicines already.

Necessidade do GPHF -Minilab®

Devido à proliferação do perigo de medicamentos falsificados, o controlo da qualidade no sistema de distribuição dos países em vias de desenvolvimento tem, actualmente, assumido nova importância. Se não se pode contar com a adesão a boas práticas na produção, distribuição e comercialização dos medicamentos, terá de se testar um maior número de amostras, de forma a manter uma garantia de qualidade adequada. Todavia, ao mesmo tempo, as análises farmacopeicas têm-se tornado cada vez mais caras e apenas alguns centros de excelência em alguns países poderão prestar este serviço. O desenvolvimento e uso de testes simples deverá, assim, facilitar o equilíbrio entre de um lado, a necessidade de aumentar o controlo dos fármacos, e do outro, a necessidade de conter custos.

O Global Pharma Health Fund (GPHF), uma instituição de beneficência iniciada e patrocinada pela Merck Darmstadt Germany, propôs-se a desenvolver e distribuir um mini-laboratório portátil, fácil de usar e compatível com o clima tropical, que pudesse verificar a identidade do fármaco e o seu conteúdo e, desta forma, detectar medicamentos falsificados, utilizando técnicas analíticas economicamente acessíveis. O GPHF – Minilab pode aumentar a capacidade de controlo nos países onde os meios para um sistema de controlo eficaz da qualidade ainda não estão plenamente instalados, ou onde a testagem plena é cara, de acesso difícil ou morosa.

O GPHF – Minilab ajudará as entidades de saúde que são responsáveis pela aquisição, armazenamento e distribuição de medicamentos a protegerem-se contra a ameaça do comércio perigoso de medicamentos falsificados. A despistagem de casos de contrafacção faz parte da actividade. A denúncia dos casos é voluntária. Uma vez informada, a GPHF pode indicar os medicamentos falsificados, mas não implementa as suas próprias investigações. Quando se identificam medicamentos falsificados, alguns prestadores de cuidados de saúde podem decidir não os pagar e outros poderão, discretamente, mudar de fornecedor. Os Minilabs não põem as pessoas na cadeia. No entanto, podem despoletar mais investigações e, de imediato, proteger os doentes contra tratamentos com medicamentos falsificados ineficazes. Concluindo, a mera possibilidade de o crime poder ser detectado, mesmo nos locais rurais mais remotos, pode dar um sinal de aviso às pessoas que estão por detrás do crime e levar, assim, à redução da proliferação de medicamentos falsificados.

The GPHF-Minilab's current list of applications servicing medicines for priority diseases and childcare in developing countries

Therapeutic Class	Individual Medicines
Analgesics (pain relievers)	Acetylsalicylic acid, Paracetamol
Antiasthmatics & Antiallergics	Aminophylline, Prednisolone, Salbutamol
Antibacterials	Amoxicillin, Ampicillin, Cephalexin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Cloxacillin, Erythromycin, Metronidazole, Phenoxymethylpenicillin, Sulfamethoxazole, Tetracycline, Trimethoprim
Antifungals	Griseofulvin
Anthelmintics	Mebendazole, Praziquantel
Antimalarials	Amodiaquine, Artemether, Artesunate, Chloroquine, Lumefantrine, Mefloquine, Primaquine, Pyrimethamine, Quinine, Sulfadoxine
Antituberculosis	Ethambutol, Isoniazid, Pyrazinamide, Rifampicin
Antivirals	Didanosine, Indinavir, Lamivudine, Nevirapine, Oseltamivir, Stavudine, Zidovudine
Others	Furosemide, Glibenclamide

GPHF-Minilab® Applications

The GPHF-Minilab focuses its work on a range of more than forty drugs instantly life-threatening when diluted down to nothing. They have been selected on the basis of prevailing prescription practices, public health interest and existing counterfeit case reports, the current short list consisting of common antimicrobials, anthelmintics, anti(retro)virals, antimalarials, antituberculosis and some other medicines. Extensions of these test methods to other active ingredients are possible. Once counterfeit versions have been detected with the Minilab, drug inspectors, hospitals, medical stores and other health care providers can move on to freeze counterfeit batches for instant patient protection and send additional samples for confirmatory testing to a fully-fledged drug quality control laboratory.

GPHF-Minilab® Content

GPHF-Minilabs contain essential lab ware and chemicals, as well as authentic tablets and capsules for reference purposes. Supplies include sufficient quantities in order to perform about a thousand assays while ensuring that the total material costs for one test run do not exceed two Euros. Two heavy-duty suitcases contain the essential components - a full range of glassware for sample extraction, preparation, pipetting and spotting, high performance chromatographic plates, developing and detection chambers, UV lamps with different wavelengths, a hot plate, a spirit lamp, test tubes, calliper rules and storage containers. Even pens and pencils are included. If needed, a digital pocket balance can easily be added. Of particular importance is a full collection of secondary reference standards for more than forty active ingredients and a set of manuals providing simple operation procedures. Written in a non-scientific format and rich in illustrations, these manuals read more like a cooking recipe than an instruction booklet. Both, this and the manual on colour reaction tests are also available in French and Spanish.

Kit for TLC tests

Kit for colour reaction tests

The GPHF-Minilab's suitcases containing basic lab equipment, manuals and a full collection of more than forty secondary reference standards

Lista actual de aplicações do GPHF-Minilab para o controlo de medicamentos para doenças prioritárias e cuidados com crianças, em países em vias de desenvolvimento

Classe terapêutica	Medicamentos Individuais
Analgésicos (para alívio da dor)	Ácido acetilsalicílico, Paracetamol
Antiasmáticos e Anti-alérgicos	Aminofilina, Prednisolona, Salbutamol
Antibacterianos	Amoxicilina, Ampicilina, Cefalexina, Cloranfenicol, Ciprofloxacina, Cloxacilina, Eritromicina, Metronidazol, Fenoximetilpenicilina, Sulfametoxazol, Tetraciclina, Trimetoprim
Antifúngicos	Griseofulvina
Antiparasitários	Mebendazol, Praziquantel
Antimaláricos	Amodiaquina, Arteméter, Artesunato, Cloroquina, Lumefantrina, Mefloquina, Primaquina, Pirimetamina, Quinina, Sulfadoxina
Antituberculosos	Etambutol, Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina
Antivirais	Didanosina, Indinavir, Lamivudina, Nevirapina, Oseltamivir, Estavudina, Zidovudina
Outros	Furosemida, Glibenclamida

Aplicações do GPHF – Minilab®

O GPHF – Minilab incide o seu trabalho num conjunto de mais de quarenta fármacos que podem causar risco de vida quando falsificados. Foram seleccionados com base em práticas de prescrição predominantes, interesses na saúde pública e relatórios sobre casos existentes de falsificação. Nesta lista de destaques constam antimicrobianos, antiparasitários, anti(retro)virais, antimaláricos, antituberculosos e alguns outros medicamentos. É possível aplicar extensões destes testes a outras substâncias activas. Quando os medicamentos falsificados são detectados com o Minilab, os agentes controladores dos medicamentos, hospitais, armazéns de medicamentos e outros produtos de saúde e outros prestadores de cuidados de saúde podem colocar os lotes em quarentena, para proteger o doente, de imediato, e enviar amostras adicionais para ser efectuada uma avaliação de confirmação, em laboratórios profissionais de controlo de qualidade.

Conteúdo do GPHF – Minilab®

O GPHF – Minilab contém material e produtos químicos de laboratório essenciais, bem como comprimidos e cápsulas autênticos, para efeitos de referência. O material é fornecido em quantidade suficiente para a realização de cerca de mil testes, assegurando que os gastos totais materiais para um teste não excedam os dois euros. Duas malas resistentes ao desgaste contêm os componentes essenciais – um conjunto completo de material de vidro para extracção, preparação, pipetagem e aplicação de amostras, placas cromatográficas de alta performance, câmaras de revelação e detecção, lâmpadas UV com diferentes comprimentos de onda, uma placa de aquecimento, uma lamparina a álcool, tubos de ensaio, régua de medição e contentores para armazenamento. Incluíram-se até canetas e lápis. Se for necessário, pode facilmente acrescentar-se uma balança digital de bolso. De particular importância é um conjunto completo de padrões secundários de referência para mais de quarenta ingredientes activos e um conjunto de manuais que fornecem procedimentos de utilização simples. Escritos num formato não-científico e rico em ilustrações, estes manuais são mais parecidos com livros de receitas do que com livros de instruções. Tanto este manual como o de Teste Colorimétricos existem também em francês e espanhol.

Kit para testes CCF

Kit para testes colorimétricos

As malas do GPHF – Minilab contendo o equipamento básico de laboratório, manuais e um conjunto completo de mais de quarenta padrões secundários de referência

GPHF-Minilab® Testing Procedures

The GPHF-Minilab takes the basic drug testing scheme published by the World Health Organization (WHO) some thirty years ago into the 21st century. New test methods have been introduced, and supplied are not only operation manuals printed in different languages, but also a complete range of lab ware, starter kit chemicals and reference standards is included – all suitably packed for global shipment by air. Now, identification of counterfeit medicines containing wrong, too little, or no ingredients at all can be performed instantly anywhere in the world. Results obtained by a set of physical and chemical screening tests must match the product label claims for, at least, drug identity and content. If they do not match or results are inconclusive, then the appropriate batches can be frozen for further investigation. GPHF-Minilabs cannot replace extensive testing on questions of drug release, chemical purity, or microbial burden; those and detailed forensic testing for court actions must be referred to a fully-fledged drug quality control laboratory that employs legally accepted methods. The GPHF-Minilab has been developed for rapid drug quality verification and counterfeit medicines detection only.

The GPHF-Minilab's scheme of physical and chemical testing			
Visual Inspection	Disintegration	Colour reaction	Thin Layer Chromatography
1. A visual inspection scheme of solid dosage forms and associated packaging material for an early rejection of the more crudely presented counterfeits.	2. A simple tablet and capsule disintegration test in order to verify label claims on enteric-coating and other modified-release systems.	3. Simplified colour reaction tests for a quick check of any drug present, thus verifying label claims on identity.	4. Easy-to-use thin layer chromatographic tests for a quick check on drug content, thus verifying label claims on potency.

GPHF-Minilab® Staff Requirements

Expert staff with lab experience will be able to use the kit straight away without further assistance. Sometimes they ask for a short refreshment training. Experts are doctors specialised in the field of clinical chemistry, pharmacists with a background in drug analysis and medical and pharmaceutical technicians performing the same jobs on adequate levels in hospitals of low-income countries. Here, pharmacists frequently prefer to be trained as Minilab trainers themselves thus reducing the amount of training otherwise delivered by the Global Pharma Health Fund and its partners. In Africa and Southeast Asia, even law enforcement and customs personnel occasional attends Minilab trainings. But this is then for information only in particular when big country studies for drug quality monitoring purposes are initiated. In such studies, support might be drawn from them for sample collection and freezing in situations where pharmacists are lacking the power of enforcement.

GPHF-Minilab® Procurement, Maintenance and Shipment

As a unique product without direct competition, procurement of GPHF-Minilabs by public institutions can be managed without tendering, which facilitates quick responds to needs in public health programming. As a product assembled for humanitarian use only, the GPHF-Minilab can cross borders with a single item customs tariff number and when partnering with United Nation Organizations shipments are facilitated even further. Non-for-profit sales make Minilabs also affordable for private non-governmental and faith-based health communities. Here, acceptance is even further enhanced by the fact that Minilabs are assembled and shipped by Technologie Transfer Marburg (TTM), a logistics facility within their own community.

Technologie Transfer Marburg is the licensed partner of the Global Pharma Health Fund responsible for Minilab assembly, invoicing and shipment. Quotes for a standard Minilab including lab equipment, reference standards, reagents and test solutions for both, TLC and dye tests, can be

Os Procedimentos de Teste do GPHF – Minilab®

O GPHF-Minilab adequa os procedimentos básicos de avaliação de medicamentos, publicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) há trinta anos, ao século XXI. Foram introduzidos novos métodos de teste e forneceram-se manuais de utilização escritos em várias línguas e uma gama completa de material de laboratório, produtos químicos básicos e padrões de referência - todos devidamente embalados para expedição por via aérea. A identificação de medicamentos que contenham fármacos que não os indicados, em quantidade insuficiente, ou que não contenham princípios activos, pode agora ser feita imediatamente, em qualquer parte do mundo. Os resultados obtidos através de um conjunto de testes físicos e químicos devem corresponder ao que está escrito na embalagem ou, pelo menos, à identificação do fármaco e do seu conteúdo. Se estes resultados não corresponderem, ou se forem inconclusivos, os lotes devem ser colocados em quarentena para se prosseguir a averiguação. Os GPHF-Minilabs não substituem os testes mais completos relativamente a questões como a libertação controlada dos fármacos, a pureza química ou a carga microbiana; estes testes e testes forenses pormenorizados, para fins legais, devem ser efectuados por um laboratório profissional de controlo de qualidade de fármacos que utilize métodos legalmente aceites. O GPHF-Minilab foi desenvolvido para verificação rápida da qualidade dos fármacos e detecção de medicamentos falsificados.

Os procedimentos do GPHF-Minilab para testes físicos e químicos			
Inspecção Visual	Desagregação	Reacções com cor	Cromatografia em Camada Fina
1. Um método de inspecção visual de formas farmacêuticas sólidas e material de embalagem associado, para uma rejeição prévia das falsificações mais grosseiras.	2. Um teste de desagregação simples a comprimidos e cápsulas, para verificar a veracidade da rotulagem em relação ao revestimento entérico e outros sistemas de libertação modificada.	3. Testes com reacções com cor simplificados para uma avaliação rápida de qualquer fármaco presente, verificando assim se a informação identificativa contida na embalagem está correcta.	4. Cromatografia em Camada Fina fácil de usar para uma análise rápida da quantidade de qualquer fármaco presente, verificando assim se a dosagem referida na embalagem está correcta.

Requisitos para os Utilizadores do GPHF-Minilab®

O pessoal especializado, com experiência de trabalho em laboratório, será capaz de utilizar o kit sem necessidade de assistência adicional. Por vezes, pedem uma curta formação para reciclagem de conhecimentos. Estes peritos são médicos especializados em química clínica, farmacêuticos com experiência em análise de fármacos e técnicos de medicina ou farmácia que executam essas mesmas funções em hospitais de países pobres. Na Alemanha, os farmacêuticos preferem frequentemente ter formação, para serem eles próprios formadores do Minilab, reduzindo assim o número de formações que ficam a cargo do Global Pharma Health Fund e seus parceiros. Em África e nos países do Sudeste asiático, até o pessoal policial e alfandegário frequenta ocasionalmente formações acerca do Minilab. Mas nesse caso isso é feito apenas para recolher informação, particularmente quando se iniciam estudos a nível nacional acerca da qualidade dos fármacos. Nesses estudos, pode conseguir-se o seu apoio para a recolha de amostras e a sua colocação em quarentena, em situações em que os farmacêuticos não têm poder para o fazer.

Aquisição, Manutenção e Expedição do GPHF-Minilab®

Como este é um produto único, sem competidor directo, a aquisição de GPHF-Minilabs por parte de instituições públicas pode ser gerida sem necessidade de recorrer a um concurso público, o que facilita a resposta rápida às necessidades do programa de saúde pública. Dado que se trata de um produto feito unicamente para fins humanitários, o GPHF-Minilab pode atravessar as fronteiras com um único número de tarifa alfandegária e, quando há uma parceria com as Organizações das Nações Unidas, as expedições são ainda mais facilitadas. As vendas sem fins lucrativos fazem com que os Minilabs sejam também acessíveis às organizações de saúde privadas, não governamentais e religiosas. Neste caso, a aceitação é ainda mais reforçada pelo facto de os Minilabs serem produzidos e expedidos pela Technologie Transfer Marburg (TTM), uma empresa de logística dentro da sua própria comunidade.

A Technologie Transfer Marburg é o parceiro oficial do Global Pharma Health Fund, responsável pela montagem, facturação e expedição do Minilab. Os orçamentos para Minilabs na versão base, incluindo equipamento de laboratório, padrões de referência, reagentes e soluções de teste para ambos, testes de CCF e testes com reacções coradas, podem ser

obtained from them (www.ttm-germany.de). Quotes may also include the costs for transport for each destination, however, the costs for clearance cannot be stated and must be investigated locally by the project itself. For Minilab maintenance, global delivery of replacement items is secured through the same supply route. Minilabs can be customised to cater for specific project needs, for example using TLC equipment and reference standards for antimalarial drug quality verification only. Depending on the final specification, the price might then go up or down.

GPHF-Minilab® User, Resources and Project Partners

Priority disease programmes from institutional development assistance are frequently using Minilabs in order to monitor the quality of medicines in malaria-, TB- and AIDS-endemic countries. Promoters and project partners are the World Health Organization (WHO) in Geneva and three major NGOs from the USA, Management Sciences for Health (MSH), the Partnership for Supply Chain Management (PFSCM) and the Drug Quality and Information programme of the United States Pharmacopeia (USP DQI), all being based in Washington DC. Support comes also from the German Technical Cooperation (GTZ) and faith-based organisations, for example, from the Medical Mission Institute Würzburg, the medicines relief organisation action medeor and the German Doctors for Developing Countries. In Tanzania, 25 Minilabs are already used as a first-line defence to protect the country's communities against the infiltration of counterfeit medicines.

Since ten years, GPHF-Minilabs are physically and financially accessible on a global scale and are protecting health facilities around the world against the infiltration of counterfeit medicines dangerous to health and life. Over 270 units are now in place in 65 countries. Within the International Medical Product AntiCounterfeiting Taskforce (IMPACT) steered by WHO, GPHF-Minilab test methods are an accepted technology for counterfeit medicines detection and patient protection in developing countries. With this backing and a proven record in global and timely Minilab delivery to almost any destination in the world, governmental and non-governmental advisory and financing bodies, for example The World Bank, The Global Fund, UNDP etc. are able to issue grants and other support to drug quality monitoring projects using Minilabs.

The imagination of the major funding agencies, the enthusiasm of local people, the established logistics and the commitment of the Global Pharma Health Fund will clearly take the Minilab initiative forward over the next ten years. In this scenario, training and teaching at schools of pharmacy, chemistry and medicine can be an additional option.

Important Notice

Counterfeit drugs represent a risk for the health and life of patients. In order to avoid erroneous test results, which could turn out to be potentially dangerous for the patients, it is essential that the instructions and tests given in this manual are carefully studied and closely followed when working with the GPHF-Minilab®.

GPHF-Minilab® Information and Contact

Global Pharma Health Fund e.V.

Walther-von-Cronberg Platz 6

60594 Frankfurt, Germany

Phone +49-69-962387-600

Fax +49-69-962387-609

info@gphf.org, www.gphf.org

The GPHF is a charitable organisation initiated and sponsored by Merck Darmstadt • Germany

pedidos a eles (www.ttm-germany.de). Os orçamentos incluem também os custos do transporte para cada destino. No entanto, é impossível definir os custos de desalfandegamento e os responsáveis dos projectos devem informar-se acerca deles junto das autoridades locais. Quanto à manutenção do Minilab, o envio de artigos de substituição é assegurado pelo mesmo canal de distribuição. Os Minilabs podem ser feitos por encomenda, para atender às necessidades específicas de cada projecto. Por exemplo, pode usar-se apenas equipamento de CCF e padrões de referência para a verificação da qualidade de fármacos antimaláricos. Dependendo das especificações finais, o preço pode aumentar ou diminuir.

Utilizador, Recursos e Parceiros de Projecto do GPHF-Minilab®

Os programas assistenciais institucionais desenvolvidos para doenças prioritárias usam frequentemente Minilabs para monitorizar a qualidade dos medicamentos em países endémicos de malária, tuberculose e SIDA. Os promotores e parceiros de projecto são a *Organização Mundial de Saúde* (OMS), em Genebra, e três importantes ONGs norte-americanas: a *Management Sciences for Health* (MSH) (Ciências de Gestão para a Saúde), a *Partnership for Supply Chain Management* (PFSCM) (Parceria para a Gestão da Cadeia de Fornecimento) e o *Programa para a Qualidade e Informação acerca dos Medicamentos da Farmacopeia Norte Americana* (USP DQI), todos com sede em Washington DC. O apoio vem também da *German Technical Cooperation* (GTZ) (Cooperação Técnica Alemã) e de organizações religiosas, como por exemplo o (Instituto Missão Médica de Wurzburg), a organização humanitária *Action Medeor*, que fornece medicamentos às pessoas necessitadas e a *German Doctors for Developing Countries* (Médicos Alemães para os Países em Vias de Desenvolvimento). Na Tanzânia, são já usados 25 Minilabs como primeira linha de defesa para proteger as comunidades do país contra a infiltração de medicamentos falsificados.

Há já dez anos que os GPHF-Minilabs estão acessíveis, física e financeiramente, à escala global, protegendo as unidades de saúde, por todo o mundo, contra a infiltração de medicamentos falsificados, perigosos para a saúde e a vida. Mais de 270 unidades estão em funcionamento em 65 países. A *International Medical Product AntiCounterfeiting Taskforce* (IMPACT), que luta contra a proliferação da falsificação de medicamentos, e que é orientada pela OMS, defende os métodos de teste do GPHF-Minilab como tecnologia a usar para a detecção de medicamentos falsificados e a protecção dos doentes nos países em vias de desenvolvimento. Face a este apoio e a um recorde comprovado na globalização e prazos de entrega do Minilab para praticamente qualquer ponto do mundo, os organismos consultivos e financeiros, governamentais e não governamentais, como por exemplo o Banco Mundial, o Fundo Mundial, o PNUD (Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas), etc., podem conceder empréstimos ou outro tipo de apoio aos projectos de controlo da qualidade dos fármacos que usem o Minilab.

A imaginação das maiores agências financiadoras, o entusiasmo da população local, os meios logísticos estabelecidos e o empenho do Global Pharma Health Fund impulsionarão, com toda a certeza, o avanço da iniciativa do Minilab durante os próximos dez anos. Neste cenário, o treino e ensino nas escolas de farmácia, química e medicina pode ser uma opção adicional.

Aviso Importante

Os fármacos falsificados representam um risco para a saúde e a vida dos doentes. De forma a evitar resultados de testes incorrectos, que poderiam tornar-se potencialmente perigosos para os doentes, é essencial que as instruções e testes que constam do manual sejam cuidadosamente estudados e rigorosamente seguidos quando se trabalha com o GPHF-Minilab®.

Informação e Contacto do GPHF-Minilab®

Global Pharma Health Fund e.V.

Walther-von-Cronberg Platz 6

60594 Frankfurt, Alemanha

Telefone: +49 69 962387 600

Fax: +49 69 962387 609

info@gphf.org www.gphf.org

A GPHF é uma instituição de beneficência iniciada e patrocinada pela Merck Darmstadt • Alemanha

2 Health and Safety

Important Notice

The chemicals travelling alongside the GPHF-Minilab® as well as pharmaceuticals to be tested may contain hazardous substances. Hence, users of the Minilab and bystanders should closely follow all instructions given in this manual in order to avoid potential health risks resulting from accidental contact with these chemical and pharmaceutical substances.

Care must be exercised in the handling of chemicals and pharmaceuticals in order to avoid generating excessive dust or vapours in the atmosphere. Extraction should be used at points of activity that, in more austere circumstances, might be replaced by simple but sufficient air ventilation.

Symptoms such as drowsiness, respiratory problems, nausea or skin rash must be reported to the supervisor especially after accidental spillage of large amounts of organic solvents.

In the event of accidental spillage or splashing of liquids affecting skin or eyes, wash with copious amounts of water, report to the supervisor and if necessary, to the local surgery for further attention.

Use protective clothes and safety spectacles when handling aggressive test solutions, for example strong acids and caustic solutions.

Use protective clothing, for example an apron and safety spectacles, prior to starting any work on colour reaction testing.

2 Saúde e Segurança

Aviso Importante

Os produtos químicos que acompanham o GPHF-Minilab® e os fármacos que são testados podem conter substâncias perigosas. Daí que os utilizadores do Minilab e quem estiver perto devam seguir rigorosamente todas as instruções dadas no manual, de modo a evitar potenciais riscos para a saúde resultantes do contacto accidental com estas substâncias químicas e farmacêuticas.

Deve ter-se cuidado no manuseamento de produtos químicos e farmacêuticos, de modo a evitar a libertação de pó ou vapores excessivos para a atmosfera. Deve usar-se a extracção em acções em que, em circunstâncias mais austeras, possa ser substituída pela simples, mas eficaz, ventilação do ar.

Sintomas como sonolência, problemas respiratórios, náuseas ou erupções cutâneas devem ser comunicados ao supervisor, especialmente após o derrame accidental de grandes quantidades de solventes orgânicos.

No caso de derrame accidental ou de saltarem salpicos de líquidos para a pele ou os olhos, lavar com água abundante, comunicar ao supervisor e, se necessário, ao médico local, para avaliação médica mais aprofundada.

Use roupas protectoras e óculos de segurança quando manusear soluções teste agressivas como, por exemplo, ácidos fortes e soluções cáusticas.

Use roupas protectoras como, por exemplo, um avental e óculos de segurança, antes de começar qualquer avaliação envolvendo reacções com cor.

3 Visual Inspection

In view of consumer protection, importers, wholesalers, disease programmes, hospitals, pharmacies and patients should be warned to stay away from unusual cheap offers promoted, for example in the internet or even less reliable sources. It is also sensible to visually inspect incoming goods for the detection of substandard quality and counterfeit medicines by regularly screening of consignments for correct documentation, labelling and packaging before consumption. On patient level, the minimum documentation could be the release of a cash memo.

The visual inspection of incoming goods could include the verification of security features (holograms, code numbers etc.) applied by originator companies for product authentication. Many counterfeit pharmaceuticals have already been identified due to poor, altered or absent printing on the packaging material, simple spelling faults, wrong product license and batch numbers, false formats for manufacturing and expiration dates and non-existing addresses for manufacturers and suppliers. Furthermore, wrong tablet shapes and engravings, wrong capsule sizes and colour schemes may also give away a clue in identifying potential counterfeit medicines.

Counterfeit ampicillin capsules collected from Bolivia, their drug content being 80% below label claim. The label from the counterfeit medicines did not show the logo and the expiry date showed the wrong format. Expiry dates are usually broken down to the year and month only. Here, even the precise day of expiration was quoted.

Visual inspection of tablets: authentication features (colour, size, shape, engraving, break bar, etc.) are helping in distinguishing genuine from counterfeit medicines.

Through different colour, size and shape each tablet and capsule presentation bears a set of authentic features for easy identification purposes. Tablets may be white or coloured. They can be circular and oval shaped or even triangular or pentagonal. The tablet's surface can be flat or convex and may have bevelled or acute edges, lines or break-marks, engravings or embossings or any other markings. Capsules could consist of hard or soft gelatine shells. Shells could be clear or opaque and contain colouring agents. For further authentication, capsules and tablets may show printed text, numbers, codes, logos or any other marks on their surface.

Visual inspection of hard gelatine capsules: authentication features (colour scheme, size, prints etc.) are helping in distinguishing genuine from counterfeit medicines.

3 Inspeção Visual

Para assegurar a protecção do consumidor, os importadores, revendedores, programas de prevenção e controlo das doenças, hospitais, farmácias e doentes devem ser avisados para não aderirem a promoções invulgarmente baratas que se encontrem, por exemplo, na internet, ou em fontes ainda menos fiáveis. Devem também proceder a uma inspeção visual, para ver se detectam medicamentos falsificados ou de baixa qualidade, verificando regularmente se as encomendas chegam com a documentação, os rótulos e as embalagens correctas, antes de serem consumidos. Relativamente ao doente, a documentação mínima pode ser a emissão de um recibo.

A inspeção visual pode incluir a verificação de marcas de segurança (hologramas, códigos numéricos, etc.) aplicadas pelos produtores legítimos para autenticar os produtos. Muitos dos medicamentos falsificados foram já identificados devido à fraca qualidade, alteração ou ausência de rotulagem na embalagem, erros simples de ortografia, números de licenças ou lotes errados, formatos e prazos de validade falsos e à inexistência da morada dos produtores e fornecedores. Além disso, o facto de os comprimidos terem formatos e gravações incorrectos, ou as cápsulas terem tamanhos e cores errados pode também denunciar a presença de potenciais falsificações.

Cápsulas de Ampicilina falsificadas, encontradas na Bolívia, contendo uma quantidade de substância activa 80% inferior à que é mencionada no rótulo. O rótulo dos medicamentos falsificados não mostrava o logótipo e o prazo de validade tinha um layout diferente. Os prazos de validade referem, normalmente, apenas o ano e o mês. Neste caso, até o dia preciso de expiração foi mencionado.

Inspeção visual de comprimidos: características de autenticação (cor, tamanho, forma, gravações, linha de quebra, etc.) têm ajudado a distinguir os medicamentos genuínos dos falsificados.

Através de cores, tamanhos e formas diferentes, cada comprimido e cápsula apresenta um conjunto de características únicas para facilitar a sua identificação. Os comprimidos podem ser brancos ou de cor. Podem ser circulares ou ovais ou até triangulares ou pentagonais. A superfície do comprimido pode ser plana ou convexa e pode ter arestas biseladas ou não, linhas ou marcas de quebra, gravações ou impressões em relevo e outras marcas. As cápsulas podem ser de gelatina dura ou de gelatina mole. O revestimento pode ser transparente ou opaco e pode conter agentes corantes. Para uma autenticação mais precisa, as cápsulas e comprimidos podem ter texto impresso, números, códigos, logótipos ou quaisquer outras marcas na sua superfície.

Inspeção visual das cápsulas de gelatina dura: as características de autenticação (esquema de cores, tamanho, impressões, etc.) têm ajudado a distinguir os medicamentos genuínos dos falsificados.

Tablets and capsules should never show any signs of physical defects and blemishes such as dirty marks or spots, mottling or discolouration, hardening or softening, fusion or swelling, abrasion or erosion, or any other defects such as cracks or chips, dents or punctures, loose powder, crystallisation or a strange smell. Hardened tablets and capsules are best identified when subjected to a disintegration test (see chapter 4).

The packaging of pharmaceutical products, where it is necessary to assemble all bits and pieces at one time, is a very complex and expensive business. This complex process and the quality of the packaging material itself is very difficult to copy for people intending to launch counterfeit products. This is why it is appropriate to start with the visual inspection of the packaging material for a pre-screening of suspicious drug products and an early rejection of the more crudely presented counterfeits.

The container can be anything from a glass bottle to a blister pack or a tube made of metal and a securitainer made of plastic. These primary or immediate containers are very often protected by a folding carton normally containing a leaflet explaining the dosing regime and the drug's action or side effects. Tablets and capsules can be presented in a single or multi unit dose container, for example in a blister pack or bottle respectively. Patient packs may contain just ten or twenty tablets dispensed into a reclosable plastic bag whereas bulk packs may contain a thousand or more tablets dispensed into a sealed aluminium pouch. Indeed, there is a sense that there are as many different types of packaging used in the pharmaceutical industry as the products they contain.

Both, the immediate container and the folding carton should have a durable label fixed on their bodies. Labels can be replaced by print. The print on the label or packaging must be in a legible and indelible manner. The

Counterfeit metronidazole tablets collected from India, their drug content being 50% below label claim. The tablets obtained a new coat making the engravings from the original tablet disappearing.

Visual inspection of packaging material and oral solid dosage forms: authentic specifications for pack, tablet and capsule sizes can be verified using, for example a ruler and calliper rule.

labels on the package and container of every official pharmaceutical product should ideally state (1) the name of the drug, (2) the drug's strength, potency or concentration, (3) the number of unit doses in the container, (4) the route of administration, (5) the manufacturer's or responsible distributor's name and full address, (6) the batch or lot number, (7) the expiry date (8) the storage conditions and (9) any other safety measures for example 'Keep away from Children'. Further label requirements exist for tablets and capsules with a modified drug release pattern. They should be

Os comprimidos e cápsulas nunca devem apresentar sinais de defeitos físicos e manchas, como marcas de sujidade ou nódoas, pintas ou descoloração, endurecimento ou amolecimento, fusão ou intumescimento, desgaste ou erosão, ou quaisquer outros defeitos, como fissuras ou falhas, amolgadelas ou perfurações, pó solto, cristalização ou um cheiro estranho. Identificam-se melhor os comprimidos e cápsulas endurecidos quando os sujeitamos a um teste de desagregação (ver capítulo 4).

O processo de embalagem dos produtos farmacêuticos, em que é necessário montar todas as partes ao mesmo tempo, é um negócio muito complexo e caro. É muito difícil, para as pessoas que querem lançar produtos falsificados, copiar este processo complexo e a própria qualidade do material da embalagem. É por isso que se deve começar pela inspecção visual das embalagens, para um pré-rastreio de medicamentos suspeitos e uma rejeição prévia das falsificações mais rudimentares.

A embalagem primária pode ter variadas formas, desde um frasco de vidro a um blister, um tubo de metal ou um recipiente PP (securitainer), feito de plástico. Estas embalagens primárias ou imediatas, que estão em contacto directo com os medicamentos, estão frequentemente protegidas por uma caixa de cartão, que contém, normalmente, um folheto a explicar a posologia, a acção do fármaco e os efeitos secundários. Os comprimidos e as cápsulas podem apresentar-se numa embalagem unidose, como um blister, ou com várias unidades juntas, como um frasco. As embalagens para os pacientes podem conter apenas dez ou vinte comprimidos, fornecidos num saco de plástico que se possa abrir e voltar a fechar, enquanto que as embalagens para produtos a granel podem conter mais de mil comprimidos, dispensados numa bolsa de alumínio selada. De facto, dá a sensação que, na indústria farmacêutica, a variedade dos tipos de embalagens usada é tão grande como a dos produtos que elas contêm.

Tanto a embalagem imediata como a caixa de cartão devem ter um rótulo permanente. Os rótulos podem ser substituídos por uma impressão. A impressão no rótulo ou na embalagem deve ser legível e indelével.

Comprimidos de metronidazol falsificados, recolhidos na Índia, contendo apenas 50% da dosagem mencionada no rótulo. O seu revestimento estava alterado, tendo desaparecido a gravação original.

Inspecção visual da embalagem e das formas de dosagem sólidas orais: as especificações autênticas para o tamanho das embalagens, comprimidos e cápsulas podem ser verificadas usando, por exemplo, uma régua e uma régua de calibração.

Os rótulos da caixa e da embalagem de cada medicamento oficial devem, idealmente, referir: (1) o nome do fármaco; (2) a potência de acção, dosagem ou concentração; (3) o número de unidades na embalagem, (4) a via de administração, (5) o nome e morada completa do fabricante ou distribuidor responsável, (6) o número do lote ou remessa, (7) o prazo de validade, (8) as condições de armazenamento e (9) quaisquer outras medidas de segurança como, por exemplo: «Manter fora do alcance das crianças». Existem outras especificações para os rótulos de comprimidos e cápsulas de libertação modificada.

identified as „enteric-coated" or „sustained release" tablets or capsules, respectively.

A batch number is a unique number that consists either of figures or letters, or a combination of figures and letters by which the history of the product can be traced back to its origin. Depending on national regulations, authorities might want to see also a printed product license and even a valid code number next to the batch number for additional product authentication and identification.

In case a pharmaceutical product is a branded product and the drug's name is not fully disclosed by its trade name (for example Aspirin) the label should also provide the scientific name of the active ingredient (for example acetylsalicylic acid). Should a label state that the product complies with all pharmacopoeial requirements then reference should be made to the appropriate pharmacopoeia including its year of issue, for example BP 2000, bearing in mind that quality will progress with time and that only products referred to the latest pharmacopoeial edition will represent the latest advance in knowledge and technology.

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to at least a dye test for identification purposes. Drug identity could further be verified using thin layer chromatography, a test holding also the power for a semi-quantitative analysis on drug content.

Batch number Manufacturing date Expiry date

Trade name

The drug's scientific name

Company Logo

The drug's strength

The manufacturer's full address

Dosage form indicating the route of administration

The number of units per container

Visual inspection of labels: prints must be legible and indelible and deliver a minimum of information. Claims on batch number, expiry date, product licence number etc. can be verified when contacting the originator company and the appropriate drug authorities responsible for product registration. Claims on drug identity and content can be verified using the GPHF-Minilab® and confirmatory compendial testing.

Counterfeit antimalarial tablets collected from Myanmar (Burma), their drug content being 100% below label claim. During visual inspection, wrong spellings, wrong expiry dates (actually expiring before date of manufacturing) and wrong holograms pointed to the fake medicines (A, B, C). Only D is genuine.

Copycats: (from left) the hologram from a genuine pack of antimalarials, a silver foil copy, and two more convincing fakes. Today, a logo printed with UV detectable ink helps in distinguishing genuine from counterfeit medicines.

Devem ser identificados como comprimidos ou cápsulas «de revestimento entérico» ou «de libertação prolongada», respectivamente.

Um número de lote é um número único constituído por números ou letras, ou por uma combinação de números e letras, através da qual se pode verificar o historial do produto até à sua origem. As autoridades podem querer ver também uma licença impressa e até um código válido, juntamente com o número do lote, para uma melhor autenticação e identificação do produto. Isto varia de acordo com as regulamentações de cada país.

Caso se trate de produto de marca e o nome do fármaco não esteja totalmente patente no nome comercial (ex.: Aspirina), o rótulo deve ainda fornecer o nome científico do ingrediente activo (ex.: ácido acetilsalicílico). Se o rótulo mencionar que o medicamento cumpre todos os requisitos farmacopeicos, deve também fazer referência à farmacopeia em causa, incluindo o ano de edição (ex.: BP 2000), tendo em conta que a qualidade irá progredir com o tempo e que só os produtos referidos na última edição da farmacopeia estarão em conformidade com os últimos avanços ao nível do conhecimento e tecnologia.

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira devem, pelo menos, ser submetidos a um teste de identificação com reacções com cor. A identidade do fármaco poderá ainda ser verificada usando a cromatografia em camada fina, que é um teste com o qual se pode também fazer uma análise semi-quantitativa do conteúdo de um medicamento.

Número do lote

Data de fabrico

Data de expiração do prazo de validade

Nome comercial

Nome científico do fármaco

Logótipo do laboratório

Acção farmacológica do fármaco

Morada completa do fabricante

Forma de dosagem, indicando a via de administração

O número de unidades por embalagem

Inspecção visual dos rótulos: as indicações impressas devem ser legíveis e indeléveis e fornecer um número mínimo de informações. Pode verificar-se a informação relativa ao número do lote, prazo de validade, número da licença, etc., contactando o fabricante original e as autoridades responsáveis pela regulamentação do registo dos medicamentos. A informação acerca da identidade e conteúdo dos fármacos pode ser verificada usando o GPHF-Minilab® e os testes de confirmação constantes dos manuais.

Comprimidos antimaláricos falsificados recolhidos em Myanmar (Burma), com conteúdo de fármaco 100% inferior ao mencionado no rótulo. Durante a inspecção visual, foi a existência de erros ortográficos (A), erros na data de expiração da validade, aqui anterior à data de fabrico (B), um holograma diferente (C), que alertou para o facto de estes medicamentos serem falsos. Apenas o D é genuíno.

Cópias: (da esquerda para a direita) o holograma de uma embalagem de antimaláricos genuína, uma cópia de folha de prata e duas outras falsificações mais convincentes. Hoje em dia, se o logótipo for impresso com tinta detectável com radiação UV, isso ajuda a distinguir os medicamentos genuínos dos falsificados.

4 Disintegration Testing

Including disintegration testing during the visual inspection of solid dosage forms helps in the detection of counterfeit medicines with false claims on modified-release systems, for example on enteric coating.

In search of counterfeit medicines, the visual inspection could be extended to a disintegration test in order to detect false claims on modified-release systems and defects on tablet and capsule hardness. Assuming that counterfeiters are lacking the knowledge and technology for the production of slow- and other modified-release formulations, for example, the application of enteric film coats resistant to gastric acid, it appears also sensible to check whether this complex tablet and capsule formulations have been replaced by their instant soluble counterparts. This can be verified by immersing tablets and capsules in water of 37° C to see whether or not they are disintegrating within thirty minutes.

On the one hand, all uncoated tablets and capsules and all soluble, dispersible, effervescent and film-coated tablets, hence all quick release formulations, have to comply with this time of complete disintegration. On the other hand, all slow-release and enteric-coated tablets and capsules and chewable formulations have to withstand this test and are not allowed to disintegrate before this time. Sugar-coated tablets may meet this specification but it is not a requirement. In real life, body fluids are digesting their coatings before disintegration can start. Even more, no reports on counterfeit sugarcoated tablets came up so far. This is almost certainly due to the fact, that sugar coating requires expert skills and technologies hardly to be found in genuine industry itself and not to be found at all in fake underground operations.

In practice, place one tablet or capsule into a wide neck bottle containing a 100 ml of water of 37°C. For a precise measurement on temperature, an alcohol thermometer comes with the GPHF-Minilab. In order to imitate body movements when digesting medicines, stir or shake the liquid from time to time and continue to operate like this for thirty minutes. The test may stop earlier if the tablets or capsules under investigation are disintegrating much faster. Disintegration is defined as that state in which no residue of the tablets or capsules, except fragments of undissolved coating or capsule shells, remains in the test solution. If a residue remains, it consists of a soft mass with no palpable core. Repeat the test with five more tablets or capsules, respectively. The batch passes the test if all six tablets or capsules disintegrate. Repeat the entire test cycle should one tablet or capsule fail to disintegrate. Reject the batch should a further tablet or capsule fail again in the second and third run. To be sure on this, you might want to check even other time points at 45 or 60 minutes. For reporting, use the form shown in chapter 9 on page 201. For more sophisticated testing follow the pharmacopoeial requirements on disintegration testing.

4 Teste de Desagregação

A inclusão de um teste de desagregação na inspecção visual de formas de dosagem sólidas ajuda a detectar os medicamentos falsificados com informação falsa quanto aos seus sistemas de libertação modificada como, por exemplo, um revestimento entérico.

Durante a procura por medicamentos falsificados, a inspecção visual pode ser alargada a um teste de desagregação, para detectar informações falsas quanto aos sistemas de libertação modificada e defeitos na dureza dos comprimidos e cápsulas. Partindo do princípio que os falsificadores não têm os conhecimentos e tecnologia apropriados para a produção de formulações de libertação lenta e de outras libertações modificadas como, por exemplo, a aplicação de revestimentos entéricos de película resistente ao ácido gástrico, deve-se também verificar se estas formulações complexas foram substituídas pelos seus homólogos de dissolução instantânea. Isto pode ser verificado imergindo os comprimidos ou cápsulas em água a 37° C, para verificar se a desagregação ocorre em menos de trinta minutos.

Por um lado, todos os comprimidos e cápsulas sem revestimento e todos os comprimidos solúveis, dispersíveis, efervescentes e revestidos por película, ou seja, todas as formulações de libertação rápida, devem cumprir este tempo de desagregação total. Por outro lado, todos os comprimidos e cápsulas de libertação lenta e de revestimento entérico e formulações mastigáveis devem resistir a este teste e não se desagregam antes deste tempo. Os comprimidos com revestimento de açúcar podem cumprir estes requisitos, mas tal não é obrigatório. No organismo humano, os fluidos corporais começam a digestão dos seus revestimentos antes do início da desagregação. Além disso, não surgiram, até à data, relatórios acerca de comprimidos revestidos a açúcar falsificados. Isto deve-se, certamente, ao facto de o revestimento de açúcar exigir capacidades e tecnologias que raramente se encontram na própria indústria genuína e que não se encontram nas instalações clandestinas.

Quando efectuar este teste coloque um comprimido ou cápsula num frasco de boca larga, contendo 100 ml de água a 37°C. O GPHF-Minilab inclui um termómetro de álcool para que a medição da temperatura seja precisa. Para imitar os movimentos do corpo quando este digere os medicamentos, agite ou abane o líquido periodicamente e continue a fazer isto durante trinta minutos. O teste pode parar antes dos trinta minutos se os comprimidos ou cápsulas que estão a ser analisados se desagregarem mais rapidamente. Define-se a desagregação como o estado no qual nenhum resíduo dos comprimidos ou cápsulas, excepto fragmentos do revestimento que não se dissolvam, permanece na solução. Se houver algum resíduo, será apenas uma massa mole, sem qualquer núcleo palpável. Repita o teste com mais cinco comprimidos ou cápsulas, respectivamente. O lote passa o teste se todos os seis comprimidos ou cápsulas se desagregarem. Repita todo o ciclo de teste se um comprimido ou cápsula não se desagregar. Rejeite o lote se houver mais um comprimido ou cápsula a não passar na segunda ou terceira corridas. Para ter a certeza, pode ainda verificar outros intervalos temporais, aos 45 ou 60 minutos. Para fazer o relatório use o formulário que consta do capítulo 9, na página 201. Para uma avaliação mais adequada siga as exigências farmacopeicas relativamente aos testes de desagregação.

5 Thin Layer Chromatographic Testing

The name chromatography was first used onset of this century by a botanist called Tswett who worked to separate coloured plant pigments. He used two Greek words, 'Chromatos' for colour and 'Grapha' for drawing, as a short description of his newly invented separation technique. A solution of mixed pigments were allowed to pass through a column of crushed chalk which on further passage of solvent finally separated the constituents of the mixture. The name chromatography has stuck since then, although most of the compounds to be separated nowadays are not necessarily coloured anymore. However, methods are now available for the visualization of uncoloured compounds, for example, the detection on exposure to ultraviolet radiation.

It was a chemist called Stahl who changed the experimental technique during the nineteen-fifties. Chalk and other adsorbents were now put on thin plates, for example onto microscope slides, and the name thin layer chromatography or in short TLC was introduced. TLC has primarily been developed as a cheap and easy to use separation and identification technique for a mixture of unknown compounds, for example, vitamin preparations. It can also be used to decide on the presence of high levels of impurities or degradation products.

It can be all of these but it can also be made quantitative in order to estimate how much of each constituent is present in a given mixture. The results obtained by a simple visual inspection of the chromatoplates with the naked eye can be as accurate as 10% if great care is taken and skill executed. Accuracy can be enhanced up to 1% when expensive ink-jet technology for spotting and video technology for chromatoplate reading is used. For our purposes and for many analyses in industry, the semi-quantitative reading with the naked eye is accurate enough. In order to achieve this minimum accuracy, closely follow the operation procedures written down for each drug compound in the individual monographs of this compendium.

5.1 How does a TLC system work?

Thin layer chromatography, like all other analytical techniques, has its specialist vocabulary, which needs to be learned before understanding how a TLC system actually works.

The mixture to be separated is called the sample and the individual constituents are called components or solutes. In our case all solutes are drugs. The sample, once in solution, is applied or spotted onto a TLC or chromatoplate. The plate itself consists of a solid support, for example glass, plastic or aluminium, coated with an adsorbent layer or stationary phase specially chosen to effect the separation.

The solute must be applied at a measured distance from the bottom of the plate called the origin line. The loaded plate is then placed in a tank or developing chamber containing an eluting solvent or mobile phase, which will flow over the plate and drive the solute away from its origin across the chromatogram. The run stops on removing the plate from the tank just before the solvent front reaches the plate's top end. The front line represents the finish and has to be marked. The distance between the origin and front line is the solute's or drug's 'racing distance' measured in millimetres.

Some of the drugs are eluted easily and get carried away alongside the mobile phase straight to the finish. Some others will never make it and stay at the origin and the rest will stop somewhere midway between the start and front line. Surprisingly, those drugs deposited midway between both lines will be the winner of the game. Only they can be identified using an authentic comparator drug as a standard or reference sample. There is strong evidence of identical drugs in the test and standard solutions if the principal spots of both samples show the same travel distance. Additional confirmation can be derived from similarities in spot size, shape and colour or accompanying satellite spots visualized by common detection techniques, for example, exposure to ultraviolet light, iodine vapour or chemical colouration.

The three major factors influencing a successful run in thin layer chromatography are the stationary phase, the mobile phase and the sample preparation. The secret of success is determined by the fine-tuning of this magic triangle.

5 Cromatografia em Camada Fina

O nome cromatografia foi usado pela primeira vez no início do século XX, por um botânico chamado Tswett, cujos trabalhos visavam separar as cores dos pigmentos das plantas. Usou duas palavras gregas, “Chromatos” para cor e “Grapha” para desenhar, para descrever resumidamente a sua nova técnica de separação, recentemente inventada. Fez-se passar uma solução com vários pigmentos misturados por uma coluna de giz esmagado, a qual, à passagem posterior de solvente, separou finalmente os constituintes da mistura. Desde então, passou a usar-se o nome cromatografia, apesar de a maioria dos componentes a separar, nos nossos dias, já não serem necessariamente coloridos. No entanto, estão agora disponíveis métodos para a visualização dos componentes sem cor como, por exemplo, a detecção pela exposição à radiação ultravioleta.

Foi um químico chamado Stahl que modificou a técnica experimental durante os anos cinquenta. Giz e outros adsorventes eram, assim, espalhados em placas finas, como por exemplo lâminas de microscópio, e começou a usar-se o nome cromatografia em camada fina ou, abreviando, CCF. A CCF foi primeiramente desenvolvida como uma técnica de separação e identificação económica e fácil de usar para uma mistura de compostos desconhecidos como, por exemplo, preparações vitamínicas. Pode, ainda, ser usada para aferir da presença de níveis elevados de impurezas ou produtos de degradação.

Pode ser tudo isto mas também pode ser um ensaio quantitativo, para determinar que quantidade de cada elemento está presente num determinado composto. Os resultados obtidos através de uma simples inspecção visual das placas cromatográficas a olho nu podem ter uma imprecisão de 10%, se esta for executada com muito cuidado e perícia. A precisão pode ser aumentada até 1% se usarmos tecnologia cara de jacto de tinta para aplicação das substâncias em análise e tecnologia vídeo para a leitura das placas cromatográficas. A leitura semi-quantitativa realizada a olho nu é suficientemente precisa para os nossos objectivos e para muitas análises industriais. Para atingir esta precisão mínima adequada, siga fielmente as instruções acerca de como actuar, para cada medicamento, constantes das monografias individuais deste manual.

5.1 Como funciona um sistema de CCF?

A cromatografia de camada fina, como qualquer outra técnica analítica, tem o seu próprio vocabulário especializado, que é necessário aprender antes de perceber como um sistema de CCF realmente funciona.

A mistura que será separada chama-se amostra e os seus constituintes individuais são os componentes ou solutos. No nosso caso todos os solutos são fármacos. Uma vez dissolvida, a amostra é aplicada numa CCF ou placa cromatográfica. A placa consiste num suporte sólido de vidro, plástico ou alumínio, por exemplo, revestido com uma camada adsorvente ou fase estacionária, escolhida especialmente para efectuar a separação.

O soluto (amostra) deve ser aplicado a uma distância medida desde o fundo da placa, que chamamos a linha de base. A placa contendo os compostos é colocada num tanque ou câmara de eluição que contém um solvente eluente ou fase móvel, que se espalhará pela placa e separará o soluto da sua origem ao longo do cromatograma. A corrida pára quando se retira a placa do tanque, mesmo antes da frente do solvente chegar ao bordo superior da placa. A frente do solvente representa o final e deve ser assinalada. A distância entre a linha de base (local de aplicação da amostra) e a frente do solvente é a distância percorrida pelo composto em análise, medida em milímetros.

Alguns fármacos são facilmente eluídos e são transportados juntamente com a fase móvel até à linha da frente. Outros nunca lá chegarão e ficam na base e o resto parará a meio caminho entre o início (local de aplicação da amostra) e a linha da frente. Surpreendentemente, esses fármacos depositados a meio caminho, entre as duas linhas, serão os vencedores deste jogo. Só eles podem ser identificados usando um fármaco autêntico comparativo como padrão ou amostra de referência. Há fortes indícios da existência de fármacos idênticos, entre o teste e soluções padrão, se as manchas principais de ambas as amostras tiverem percorrido a mesma distância. Obter-se-á uma confirmação adicional se existirem semelhanças no tamanho, forma e cor das manchas ou fazendo o acompanhamento de manchas secundárias observadas através de técnicas de detecção comuns como, por exemplo, a exposição à luz ultravioleta, ao vapor de iodo ou à coloração química.

Os três factores que mais influenciam o sucesso da separação cromatográfica em camada fina são a fase estacionária, a fase móvel e a preparação da amostra. O segredo para o sucesso é determinado pela afinação deste triângulo mágico.

5.2 Stationary phase

The solid layer on a TLC plate is generally called the adsorbent. The nature and properties of the adsorbent are of crucial importance to the technique.

Adsorbents come with a wide variety of chemical structures consisting of very fine particles. Those particles are far from being perfectly round like billiard balls. In fact, they show porous surfaces whereby all pores provide additional surface area for adsorption. The surface area of a strong adsorbent will have an area of up to 500 square metres per gram. A microscope slide coated with eight grams of such an adsorbent will easily match the size of a football pitch, which is truly a huge 'racing course' for such small things like molecules.

Silica gel is the most popular adsorbent. It comes in different particle sizes and with or without a binder denoted by the abbreviation G or H respectively. Additional coating with a fluorescent indicator is indicated by the abbreviation F 254. This does allow an easy detection of uncoloured spots with an ultraviolet light source of 254 nanometres. A few drugs need other adsorbents. For example, all tetracycline type of drugs are separated best on TLC plates coated with cellulose, however, these plates are difficult to handle in practice and their use has therefore been avoided.

Bear in mind that adsorbents made of silica gel are quickly de-activated by moist atmosphere. However, the commercial plates supplied by Merck Darmstadt - Germany work perfectly well without prior drying when carefully stored in their original packaging. Merck aluminium or glass plates coated with silica gel 60 F254 have been found most satisfactory. Plates of 5 X 10 cm in size are required for our developing chambers.

In the starter set, 400 thin layer chromatographic plates, also called TLC or chromatoplates, are supplied alongside the GPHF-Minilab®. These are coated aluminium plates, the coat consisting of an adsorbent called silica gel 60 F254. They arrive in packs of fifty and are perfectly sized (5 x 10 cm) in order to fit into the TLC chamber supplied.

Note: Open the pack just before use. Remove one plate only. Return the package into the airtight protector case. Avoid contact with moisture. Store in a dry place. Do not touch or scratch the plate's surface.

5.2 Fase estacionária

A fase sólida numa placa de CCF é normalmente chamada o adsorvente. A natureza e as propriedades do adsorvente são de importância crucial para esta técnica.

Os adsorventes são constituídos por uma variedade extensa de estruturas químicas que consistem em partículas muito finas. Estas partículas não são perfeitamente redondas. De facto, apresentam superfícies porosas, constituindo todos os poros uma superfície adicional para adsorção. A área de superfície de um adsorvente forte poderá atingir os 500 metros quadrados por grama. Uma lâmina de microscópio revestida com oito gramas desse adsorvente facilmente atingirá a área de um campo de futebol, que é um percurso de corrida enorme para partículas tão pequenas como as moléculas.

O gel de sílica é o adsorvente mais usado. Existe com diferentes tamanhos de partícula, com ou sem um agente de ligação, indicado pela abreviatura G ou H, respectivamente. O revestimento adicional com um indicador fluorescente é denominado pela abreviatura F 254. Isto permite uma detecção fácil de manchas sem coloração com uma fonte de luz ultravioleta de 254 nanómetros. Alguns fármacos necessitam de outros adsorventes. Por exemplo, todos os medicamentos do tipo das tetraciclinas separam-se melhor em placas de CCF revestidas com celulose. No entanto, estas placas são difíceis de manusear e o seu uso tem, por isso, sido evitado.

Tenha em mente que os adsorventes constituídos por gel de sílica são rapidamente desactivados numa atmosfera húmida. No entanto, as placas comerciais fornecidas pela Merck Darmstadt – Alemanha funcionam perfeitamente sem a sua prévia secagem, se forem cuidadosamente armazenadas na sua embalagem original. As placas Merck de alumínio ou vidro revestidas com gel de sílica 60 F254 têm sido consideradas muito satisfatórias. Para as nossas câmaras de eluição são necessárias placas de 5X10 cm.

No conjunto de arranque são fornecidas 400 placas cromatográficas de camada fina, também chamadas CCF ou cromatoplasas, juntamente com o GPHF-Minilab®. Estas placas têm suporte de alumínio, sendo o revestimento constituído por um adsorvente chamado gel de sílica 60 F254. São fornecidas em embalagens de cinquenta e cabem perfeitamente (tamanho 5X10 cm) na câmara CCF fornecida.

Nota: Abra a embalagem apenas no momento de a usar. Retire apenas uma placa. Volte a colocar a embalagem na caixa protectora hermeticamente fechada. Evite o contacto com humidade. Guarde num local seco. Não toque ou risque a superfície da placa.

TLC plate coated with adsorbent
Origin line
Mobile phase

Lid
Developing tank
Sample spots

5.3 Mobile Phase

The mobile phase has two vital jobs to do. First, it must displace the drug from the adsorbent so that it can be carried in the mobile phase across the plate. Secondly, it must help to separate a mixture of drugs, excipients and impurities so that they can be deposited in different places of the chromatoplate and subsequently be identified. The effectiveness of a solvent in displacing solutes from an adsorbent is called eluting power. This power can be adjusted by using a mixture of different solvents further called the solvent system. All solvent mixtures have already individually been designed for each drug listed in this compendium.

The major solvents used here are methanol, acetone, toluene and ethyl acetate sometimes spiked with glacial acetic acid or ammonia solution in order to enhance the eluting power for a specific drug that might otherwise keep staying at the origin of the chromatoplate. It's like automobiles. Some run on unleaded petrol, others only on petrol spiked with lead and some others just won't run.

In order to obtain reproducible results it must be ensured that the atmosphere in the TLC tank is saturated with respect to the solvent vapour. Pour all the solvent required into the tank and line all sides with filter paper leaving just a small slot for observation purposes. Close the tank and wait for about 15 minutes prior adding the loaded TLC plate. With mixed solvents, saturation of the air becomes even more important. Those mixtures must be prepared immediately before use and be rejected after the run. Otherwise evaporation of one or more solvents will occur and results can't be reproduced from one day to the other.

Placa de CCF revestida com adsorvente

Linha de base

Fase móvel

Tampa

Tanque de eluição

Manchas da amostra

5.3 Fase móvel

A fase móvel tem de realizar duas tarefas vitais. Primeiro, tem de separar o fármaco do adsorvente, para que possa ser transportado ao longo da placa na fase móvel. Em segundo lugar, tem de ajudar a separar a mistura de fármacos, excipientes e impurezas, para que possam ser depositados em locais diferentes da placa cromatográfica e posteriormente identificados. A eficácia de um solvente para separar solutos de um adsorvente chama-se capacidade de eluição. Esta capacidade pode ser ajustada usando uma mistura de diferentes solventes a que se chamará o sistema eluente. Todas as misturas de solventes foram já individualmente estabelecidas para cada fármaco constante da lista deste manual.

Os solventes mais importantes aqui usados são o metanol, a acetona, o tolueno e o acetato de etilo, a que por vezes se adiciona ácido acético glacial, ou solução de amónia, para melhorar a capacidade de eluição dum medicamento específico que poderia, se não se realizasse este procedimento, continuar a ficar na base da placa cromatográfica. É como o que acontece com os automóveis. Uns funcionam a gasolina sem chumbo, outros só a gasolina com chumbo e ainda outros simplesmente não funcionam.

Para obter resultados que se possam reproduzir, é necessário assegurar que a atmosfera na câmara de CCF está saturada no que diz respeito ao vapor do solvente. Verta para a câmara todo o solvente necessário e revista todos os lados com papel de filtro, deixando apenas uma pequena ranhura para permitir efectuar observações. Feche a câmara e espere durante 15 minutos antes de introduzir a placa de CCF contendo os compostos já aplicados. Com misturas de solventes, a saturação do ar torna-se ainda mais importante. Essas misturas devem ser preparadas imediatamente antes de serem usadas e eliminadas após o teste. De outra forma, dar-se-á a evaporação de um ou mais solventes e os resultados não poderão ser reproduzidos de um dia para o outro.

5.4 Sample preparation

The sample specimen can be anything from an aqueous solution to a mixture of oils or be a semi-solid product such as creams and ointments or it can be tablets or capsules containing a solid active ingredient. Each type of sample needs different treatment prior to application on a TLC plate. Currently, this work is focusing on oral solid dosage forms and some oral and injectable fluids only.

Unlike fluids, solid samples such as drugs embedded in tablets or capsules cannot be applied directly to the TLC plate. They must be extracted and dissolved in a suitable solvent. After extraction, most stock solutions are further diluted to their final working solutions using, in all cases, a set of straight pipettes capable of delivering a known volume of 0.01 to 25 ml. Both, type and amount of extraction solvent have already been determined and are described in each individual testing protocol.

The preparation of standard and test solutions requires at least one whole unit of an oral solid dosage form.

The GPHF-Minilab® supplies an appropriate collection of authentic secondary reference standards capable of supporting about a 1000 TLC runs. They are packed in a set of tamper-evident sealed plastic tubes each containing 20 to 100 reference tablets or capsules respectively. As all other Minilab replacement items, they can be ordered as full set or individually.

Note: After having removed a reference tablet or capsule, tightly close the container to ensure that the other reference samples do not reach their expiry date before time.

Sachets are emptied directly over a laboratory glass bottle making sure that all residual solids are finally washed down into that bottle with a known volume of extraction solvent.

5.4 Preparação das amostras

A amostra pode ser qualquer coisa, desde uma solução aquosa a uma mistura de óleos ou produtos semi-sólidos, como cremes ou pomadas ou podem ser comprimidos ou cápsulas que contenham um ingrediente sólido activo. Cada tipo de amostra necessita de tratamento diferente antes de ser aplicado numa placa de CCF. Presentemente, este trabalho foca apenas as formas de dosagem sólidas orais e alguns líquidos orais e injectáveis.

Ao contrário dos líquidos, as amostras sólidas, como os fármacos nas formas de comprimidos ou cápsulas, não podem ser aplicadas directamente na placa de CCF. Têm de ser extraídas e dissolvidas num solvente adequado. Após a extracção, a maioria das soluções concentradas são ainda diluídas até às suas soluções de trabalho finais usando-se, em todos os casos, um conjunto de pipetas graduadas capazes de conter um volume conhecido de 0,01 a 25 ml. Tanto o tipo como a quantidade de solvente da extracção foram já estabelecidos e são descritos em cada protocolo de teste individual.

A preparação de soluções padrão e de teste requer pelo menos uma unidade completa de uma forma de dosagem sólida oral.

O GPHF-Minilab® fornece um conjunto apropriado de padrões de referência secundários autênticos capazes de efectuar cerca de 1000 corridas de CCF. Estão embalados num conjunto de tubos de plástico selados, com um fecho de segurança, contendo cada um 20 a 100 comprimidos ou cápsulas de referência, respectivamente. Tal como todos os outros itens de reposição do Minilab, podem ser encomendados como conjunto completo ou individualmente.

Nota: Após a remoção de um comprimido ou cápsula de referência, feche firmemente a embalagem, para assegurar que as outras amostras de referência não expiram antes do prazo de validade.

As saquetas são esvaziadas directamente para um frasco de vidro de laboratório, assegurando-se no fim que todos os sólidos residuais são lavados, para o frasco, com um volume conhecido de solvente de extracção.

Hard gelatine capsules are opened and emptied directly over a laboratory glass bottle, the cap and body shells being added last.

Soft gelatine capsules are cut into pieces using a scalpel, blade or pair of scissors. All pieces are completely transferred into a laboratory glass bottle ensuring that all blades are finally rinsed with a known volume of the appropriate extraction solvent as directed in the individual protocol.

As cápsulas de gelatina dura abrem-se e esvaziam-se directamente para um frasco de vidro de laboratório, colocando-se o corpo da tampa das cápsulas no fim.

As cápsulas de gelatina mole cortam-se em pedaços usando um bisturi, uma lâmina ou uma tesoura. Todos os pedaços são colocados na sua totalidade num frasco de vidro de laboratório, assegurando-se de que todas as lâminas são depois lavadas com um volume conhecido do solvente de extracção apropriado, como indicado no protocolo individual.

Tablets are crushed with a pestle prior to extraction, the precise procedure being as follows: Wrap up a tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder. Empty the aluminium foil over a laboratory glass bottle. Finally, rinse the foil with the appropriate extraction solvent thus ensuring that none of the powder gets lost.

All solids are dissolved in a known volume of extraction solvent using a set of various straight pipettes capable of delivering an accurate volume of 0.01 to 25.0 ml of solvent. The solution obtained will be either the stock standard or stock sample solution each of them requiring further dilution to their final concentrations, the working standard or sample solution.

A set of laboratory glass bottles facilitates sample extraction and the preparation of stock and working solutions. They come in different sizes and can also be used as interim storage containers for freshly prepared reagent solutions, extraction solvents and eluents.

All containers have Teflon-lined, leak-proofed caps protecting the sample solutions from evaporation and the Minilab user from exposure to organic solvents.

Os comprimidos são esmagados com um pilão antes de serem extraídos, sendo o procedimento exacto o seguinte: embrulhe um comprimido em folha de alumínio e esmague-o até se tornar num pó fino. Esvazie a folha de alumínio para dentro de um frasco de vidro de laboratório. Por fim, lave a folha de alumínio com o solvente de extracção adequado, assegurando-se de que nenhum pó se perde.

Todos os sólidos são dissolvidos num volume conhecido de solvente de extracção, usando um conjunto de várias pipetas capazes de transferir um volume exacto de 0,01 a 25 ml de solvente. A solução obtida será ou a solução padrão concentrada ou a solução amostra concentrada, necessitando cada uma de ser diluída até à sua concentração final, padrão de trabalho ou solução amostra.

Um conjunto de frascos de vidro de laboratório facilita a extracção das amostras e a preparação das soluções intermédias e de trabalho. São de diferentes tamanhos e podem também ser temporariamente usados como recipientes para guardar soluções de reagentes recentemente preparadas, solventes de extracção e eluentes.

Todos os recipientes têm tampas com um revestimento de teflon à prova de perdas, para proteger as soluções amostra da evaporação e o utilizador do Minilab da exposição a solventes orgânicos.

Pipetting: Hold the pipette in a vertical position to check that the solvent reaches the desired graduation mark (A). The mark should be in line with the bottom of the meniscus formed by the solvent.

The tip of the pipette (B) should be held against the side of the bottle.

A pump (C) is added as a pipetting aid, thus eliminating the need for dangerous mouth pipetting.

Warning! All organic solvents are easily inflammable. Hence, stay away from flames or other ignition sources! All solvents are toxic. Avoid dangerous mouth pipetting. Use the pumpette supplied. Do not risk your health!

Use the set of straight pipettes supplied in order to dilute the stock solutions down to their final working concentration. A set of 10-ml vials (small glass bottles) should accommodate the working solutions.

Label tape and marker pens are added to the Minilab for the permanent identification of the stock and working solutions. The label tape works well with all glass and plastic lab ware. The marker pen is water-resistant and works on all surfaces.

Pipetagem: Segure a pipeta numa posição vertical, para verificar se o solvente se encontra na medida desejada (A). A medida deve estar alinhada com a parte inferior do menisco formado pelo solvente.

Deve segurar-se a ponta da pipeta (B) contra a parte lateral (interna) do frasco.

Do conjunto consta também uma pompete (C) como acessório, eliminando assim a necessidade de pipetar com a boca, o que seria perigoso.

Aviso! Todos os solventes orgânicos são facilmente inflamáveis. Por isso, afaste-se de chamas ou outras fontes de ignição! Todos os solventes são tóxicos. Evite pipetar com a boca. Use a pompete fornecida. Não arrisque a sua saúde!

Use o conjunto de pipetas graduadas fornecido, para diluir as soluções concentradas até à sua concentração de trabalho final. As soluções de trabalho devem estar contidas num conjunto de frascos de vidro pequenos de 10 ml.

Junto com o Minilab há fita para etiquetar e canetas marcadoras para a identificação permanente das soluções concentradas e de trabalho. A fita rotuladora funciona bem com todo o material de laboratório de vidro e plástico. O marcador é resistente à água e funciona em todas as superfícies.

5.5 Sample application

The sample solutions should be spotted in one go on the origin line and the spot should have the smallest diameter possible. Test and reference solutions consisting of low volatile solvents, for example acetic acid and water produce very small spot areas. Contrarily, highly volatile solvents form very big spots and methanol forms the biggest spots of them all, especially when working under tropical climate conditions. Here, room temperatures of 30°C are easily exceeded and a maximum spreading of the spots can be observed.

Applications are made with disposable microcapillary pipettes capable of delivering a known volume of 2 micro litres (pl) when filled from end to end. Prior to spotting, draw a line across the origin about 1.5 cm above the bottom end of the TLC plate thus ensuring that the spots are evenly spaced across the plate. It is best to use a pencil of soft grade and a ruler to draw this line. Interrupt the line where samples shall be spotted.

Up to five spots can be placed on a plate of 5 x 10 cm at a time. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameter never should. Different intensities are due to different amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Spotting is precision work and might need some training. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

It is important not to scratch the adsorbent layer when the drug solution is applied as marks cause the mobile phase to elute unevenly and the spots can become distorted (see run number three of the TLC plate shown on page 30).

Finally, place the chromatoplate in the developing tank ensuring that the level of mobile phase does not reach where the samples have been spotted.

A pencil of soft grade and a ruler are supplied allowing to mark the origin and front line on a chromatoplate as well as the spot size after visualization with an ultraviolet light detector.

Disposable glass microcapillaries are supplied for sample application. They take on and deliver an accurate volume of 2 micro litres (pl) when filled and emptied perfectly from end to end.

5.5 Aplicação das amostras

As soluções amostra devem ser aplicadas de uma só vez na linha de base e a mancha deve ter um diâmetro o mais pequeno possível. As soluções de teste e de referência que são constituídas por solventes de baixa volatilidade, como o ácido acético e a água, por exemplo, originam manchas com áreas muito pequenas. Contrariamente, os solventes com alta volatilidade formam manchas muito grandes e o metanol forma as manchas maiores, especialmente quando se trabalha em condições de clima tropical. Aqui, temperaturas ambiente de 30°C são facilmente excedidas e pode observar-se a extensão máxima das manchas.

As aplicações são feitas com pipetas microcapilares descartáveis capazes de fornecer um volume conhecido de 2 microlitros (μl) quando se enchem totalmente. Antes de fazer a aplicação, trace uma linha ao longo da base cerca de 1,5 cm por cima da extremidade inferior da placa de CCF, garantindo assim que as manchas estão uniformemente espaçadas ao longo da placa. É melhor usar um lápis de mina mole e uma régua para desenhar esta linha. Interrompa a linha onde as amostras serão colocadas.

Numa placa de 5 X 10 cm podem efectuar-se até cinco aplicações de cada vez. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem variar, o seu diâmetro não deve variar. As diferentes intensidades devem-se a diferentes quantidades de excipientes dos comprimidos e das cápsulas ou concentrações diferentes dos fármacos nas soluções amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. A aplicação de amostras é um trabalho de precisão que pode necessitar de algum treino. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira vez.

É importante não danificar a camada adsorvente quando a solução do fármaco em análise é aplicada, pois essas marcas fazem com que a fase móvel elua de forma irregular e as manchas podem ficar distorcidas (ver a corrida número três da placa de CCF mostrada na página 30).

Por fim, coloque a placa de cromatografia na câmara de eluição, garantindo que o nível da fase móvel esteja abaixo da linha de aplicação das amostras.

Fornece-se um lápis de mina mole e uma régua, para marcar a linha de base e a linha da frente numa placa de cromatografia e o tamanho da mancha, após visualização com um detector de luz ultravioleta.

São fornecidos microcapilares de vidro descartáveis para aplicação das amostras. Podem conter e fornecer um volume exacto de 2 microlitros (μl) quando se enchem e esvaziam completamente.

Apply the sample at the origin line of the TLC plate using a microcapillary filled with the appropriate working solution. Rinse the capillary three times with extraction solvent (filling with solvent and evacuating via a piece of paper tissue or filter paper) before spotting the next sample onto the plate. Dispose of the capillary when one chromatoplate has been fully loaded thus avoiding the risk of cross contamination between samples containing different drug concentrations or even different compounds.

Before plate development, check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. Most spots will become easily visible and all of them should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note: Spotting is precision work and it might need some training to become perfect. It is important not to scratch the absorbent layer as marks cause the mobile phase to elute unevenly and some spots might become distorted.

Aplique a amostra na linha de base da placa de CCF usando um microcapilar de vidro cheio da solução de trabalho apropriada. Lave o capilar três vezes com solvente de extração (encha com solvente e escorra usando um pedaço de lenço de papel ou papel de filtro) antes de colocar a próxima amostra na placa. Descarte o microcapilar quando uma placa de cromatografia tiver sido totalmente preenchida, evitando assim o risco de contaminação cruzada entre amostras que contenham diferentes concentrações dos fármacos ou até compostos diferentes.

Antes da eluição da placa, verifique a uniformidade de todas as manchas, usando uma luz UV de 254 nm. A maioria das manchas ficará facilmente visível e todas devem ter forma circular e estar espaçadas regularmente ao longo da linha de base. Repita este passo, se não conseguir uma marcação homogênea à primeira vez.

Nota: A aplicação de amostras é um trabalho de precisão que pode necessitar de algum treino para ficar perfeito. É importante não danificar a camada adsorvente, pois essas marcas fazem com que a fase móvel elua de forma irregular e algumas manchas podem ficar distorcidas.

5.6 Chromatoplate development

A jar with a lid serves as developing tank. All sides of the jar are to be lined with filter paper ensuring saturation of the tank's atmosphere with solvent vapour prior to adding the loaded TLC plates for development. Cut the filter paper down to size for a nice fit in the jar. Use the pair of scissors supplied.

Use the set of straight and transfer pipettes supplied for the preparation of the mobile phase; the actual vehicle that drives the sample spots along the TLC plate. Pipette all different solvents into the developing tank as directed in the individual monograph and mix. Close the tank and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the TLC chamber with solvent vapour. Finally place a loaded TLC plate into the tank and wait till the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate.

Note: Freshly prepare the mobile phase for each day's work. Never return used solvents into their storage container!

Warning! All solvents are toxic. Avoid dangerous mouth pipetting. Use the pumpette supplied. Do not risk your health!

Once the chromatoplate has been developed, remove it from the TLC tank and allow any excess solvent to evaporate. A hot plate might be used in order to cut down the time for drying. The latter procedure is preferred if the mobile phase consists of low volatile solvents, for example ethyl acetate, toluene or water.

Without easy access to electricity, plates can also be air-dried. But this is a more time consuming procedure.

5.6 Eluição da placa cromatográfica

Como câmara de eluição usa-se um frasco com tampa (de rosca). Todo o frasco deve ser revestido com papel de filtro, antes de introduzir as placas de CCF para eluição, de modo a assegurar a saturação da atmosfera dentro do frasco com vapor do solvente. Corte o papel de filtro de modo a ficar com uma dimensão adequada ao frasco. Use as tesouras fornecidas.

Use o conjunto de pipetas graduadas e de transferência fornecidas para a preparação da fase móvel; o próprio eluente marca a placa de CCF. Adicione todos os diferentes solventes através das pipetas para a câmara de eluição, conforme as instruções de cada monografia, e misture. Feche o frasco e aguarde cerca de 15 minutos, de modo a assegurar a saturação da câmara de CCF com o vapor dos solventes. Por último, coloque no frasco uma placa de CCF contendo os compostos e espere até que a placa adsorva o solvente até cerca de três-quartos do comprimento da mesma.

Nota: Prepare diariamente uma nova fase móvel. Nunca volte a colocar os solventes usados nos recipientes onde estavam armazenados!

Aviso! Todos os solventes são tóxicos. Evite pipetar com a boca. Use a pompete fornecida. Não arrisque a sua saúde!

Assim que a placa cromatográfica tiver sido eluída, retire-a da câmara de CCF e aguarde que o excesso de solventes se evapore. Poderá usar a placa de aquecimento para encurtar o tempo de secagem. Se a fase móvel for constituída por solventes pouco voláteis, como por exemplo éter, acetato de etilo, tolueno ou água, é preferível efectuar este procedimento.

Se não houver acesso fácil à electricidade, as placas podem também secar à temperatura ambiente. Contudo, este procedimento requer mais tempo.

In our case, a Philips World Travel Iron, placed upside down, serves as a hot plate. The iron can safely be used from all electrical circuits and is fitted with a voltage selector (110 to 240 V). As electrical sockets are not the same everywhere, an adaptor plug is added to the Minilab.

Warning! Avoid direct contact with the hot plate. Switch off the plate after use.

5.7 Sample detection

Only a few drugs, for example rifampicin, are visible at daylight and do not require a specialised detection technique for their visualization. Uncoloured spots can be made visible for evaluation by exposing the loaded chromatoplate to UV-light of certain wavelengths, to iodine vapour or to specific colouring agents, for example, to ninhydrin in order to detect amino groups in ethambutol.

After drying off all solvent, the chromatoplate is first observed at daylight followed by an inspection with UV-light in the dark. Two different wavelengths are used for UV detection: short waves of 254 and long waves of 366 nanometres. Due to a fluorescent agent, the white adsorbent layer of the chromatoplate will entirely turn into soft green when exposed to UV-light of 254 nm. In most cases, drugs will cover up the adsorbent layer, extinguish the fluorescence and form black, dark blue or violet spots for easy plate reading. On exposure to UV-light of 366 nm, the chromatoplate stays pitch-black, however, when loaded with drugs sensitive to this wavelength the appropriate spots will be stimulated and return visible light, the actual colour depending on the drug under scrutiny. For example, spots made of amoxicillin are blue to violet and spots consisting of tetracycline are yellow. Observe the size and intensity of all visible spots and mark their sizes and shapes with the pencil supplied prior to leaving the dark room.

After UV illumination, further detection of the plates could take place via iodine staining. For this, put a loaded but solvent-free chromatoplate into a jar containing iodine crystals and an atmosphere full of iodine vapour.

Leave the plate to sit there for about three minutes. Uncoloured spots are attracting iodine vapour and are gradually turning brown for further evaluation at daylight. Again, observe the size and intensity of the spots and mark them with a soft pencil for documentation purposes.

No nosso caso, um ferro de engomar Philips World Travel, virado para cima, pode servir como placa de aquecimento. O ferro de engomar pode ser usado de forma segura, relativamente a todos os circuitos eléctricos, e está equipado com um selector de voltagem (de 110 a 240V). Como as tomadas eléctricas não são todas iguais, foi adicionado um adaptador ao Minilab.

Aviso! Evite o contacto directo com a placa de aquecimento. Desligue a placa depois de a usar.

5.7 Revelação do cromatograma

Apenas alguns medicamentos, como por exemplo a rifampicina, são visíveis à luz do dia e não necessitam de uma técnica de detecção especializada para serem visualizados. Pode tornar visíveis as manchas incolores através da exposição da placa cromatográfica, contendo os compostos, a luzes ultravioleta a um determinado comprimento de onda, a vapor de iodo ou a agentes corantes específicos, como por exemplo ninhidrina, para detectar grupos amina em etambutol.

Após a evaporação de todos os solventes, a placa cromatográfica deve ser primeiro observada à luz do dia e posteriormente através de uma inspecção com luz ultravioleta, no escuro. São usados dois comprimentos de onda diferentes para a detecção com luz ultravioleta: ondas curtas de 254 e ondas mais longas de 366 nanómetros. Devido a um agente fluorescente, a camada branca adsorvente da placa cromatográfica ficará ligeiramente esverdeada quando exposta à luz ultravioleta a 254 nm. Na maioria dos casos, os fármacos vão cobrir a camada adsorvente, extinguir a fluorescência e formar manchas pretas, azul escuras ou violetas, de forma a facilitar a leitura da placa. Ao ser exposta a luz ultravioleta a 366 nm, a placa cromatográfica permanece preta. Contudo, quando aplicados fármacos sensíveis a este comprimento de onda, estes serão estimulados e irão originar luz visível, cuja cor dependerá do fármaco em análise. Por exemplo, as manchas de amoxicilina coram entre azul e violeta e as manchas de tetraciclina são amarelas. Observe o tamanho e intensidade de todas as manchas visíveis e marque os seus tamanhos e formas com o lápis fornecido, antes de sair da sala escura.

Após a iluminação com luz UV, pode detectar mais manchas na placa através da marcação com iodo. Para tal, coloque uma placa cromatográfica contendo os compostos, mas sem solventes, num frasco com cristais de iodo e uma atmosfera saturada de vapor de iodo.

Deixe a placa repousar, no interior do frasco, durante cerca de três minutos. As manchas incolores atraem o vapor de iodo e vão, gradualmente, tornar-se castanhas para posterior avaliação à luz do dia. Observe, novamente, os tamanhos e a intensidade das manchas e marque-as, ligeiramente, com o lápis, de forma a ficarem documentadas.

A battery driven ultra-violet lamp capable of radiating short waves of 254 nanometres is supplied for the detection of invisible spots on the chromatoplate. Move the developed plate to a dark room or place below a table, in a drawer, box or cabinet and expose it to the UV light source. Now, all spots sensitive to this light will become visible. Mark them for further evaluation using the pencil supplied.

Warning! Do not look directly into the UV light source when in use thus avoiding potential eye injuries.

A second battery driven ultra-violet lamp capable of radiating long waves of 366 nanometres for further detection of invisible spots. Again, move the chromatoplate to a dark room or place below a table, in a drawer, box or cabinet and expose it to the UV light source. Now, all spots sensitive to this light will become visible. Mark them for further evaluation using the pencil supplied.

Note: This detection method will work only with perfectly dry chromatoplates without any residual solvent left on the adsorbent layer.

A second jar is supplied in order to establish a tank for iodine staining of invisible spots failing UV detection. Add some iodine crystals to the jar, close and heat it on a hot plate for about thirty seconds. Alternatively, expose the dosed jar to direct sunlight for about five minutes. The iodine starts to sublime gradually saturating the jar's atmosphere with iodine vapour indicated by a deep violet mist.

Place the chromatoplate into the tank and most invisible spots are gradually turning yellowish brown. The developing time is completed after about one minute.

Fornecemos uma lanterna com lâmpada ultravioleta capaz de irradiar ondas curtas de 254 nanómetros, para a detecção de manchas invisíveis a olho nu na placa cromatográfica. Transfira a placa para uma divisão escura ou coloque-a debaixo de uma mesa, caixa ou armário e exponha-a à fonte de luz ultravioleta. Todas as manchas sensíveis a esta luz irão tornar-se visíveis de imediato. Marque-as com o lápis fornecido, para futura avaliação.

Aviso! Não olhe directamente para a fonte de luz ultravioleta quando a usar, de modo a evitar potenciais danos oculares.

Fornecemos, também, uma segunda lanterna com uma lâmpada ultravioleta capaz de irradiar ondas mais longas de 366 nanómetros, para futura detecção de manchas invisíveis. Transfira, novamente, a placa cromatográfica para uma divisão escura ou coloque-a debaixo de uma mesa, caixa ou armário ou numa gaveta, e exponha-a à fonte de luz ultravioleta. Todas as manchas sensíveis a esta luz irão tornar-se visíveis de imediato. Marque-as com o lápis fornecido, para futura avaliação.

Nota: Este método de detecção funcionará apenas com placas cromatográficas completamente secas, sem quaisquer resíduos de solventes na camada adsorvente.

Fornecemos outro frasco para funcionar como depósito para a marcação com iodo das manchas invisíveis que não sejam identificadas com luz ultravioleta. Adicione alguns cristais de iodo ao frasco, feche-o e aqueça-o numa placa de aquecimento durante cerca de 30 segundos. Em alternativa, exponha o frasco fechado, com iodo, à luz solar directa, durante cerca de cinco minutos. O iodo começa a sublimar, gradualmente, saturando a atmosfera do frasco com vapor de iodo, caracterizado por uma neblina violeta intensa.

Coloque a placa cromatográfica no frasco; a maioria das manchas invisíveis irá tornar-se, gradualmente, amarelo-acastanhado. O tempo de revelação será de cerca de um minuto.

(Solvent front)

Rifampicin's principal spot

Ethambutol's principal spot

(Origin line)

In cases where the detection with UV light or iodine vapour is not working, the spots must be made visible by exposing them to more specific colouring agents. Where fuming cabinets with extraction hoods are available, the colouring agent can be dissolved and applied by spraying. Without extraction hood, dipping of the plates into the reagent solution is an alternative. It is less perfect and requires some training in order to avoid the risk of spot distortions or washing off sample spots. Here, spots consisting of ethambutol have been stained on the plate with ninhydrin reagent solution.

A beaker can be used to accommodate the staining solution. In the first step, quickly dip the developed TLC plate into the reagent solution. Make sure that the area where the spots are expected is completely soaked, then, instantly remove the chromatoplate from the solution. This step must be finished within a second in order to avoid spot distortions.

After removing the TLC plate from the staining solution, place the bottom of the plate on tissue paper and let all surplus reagent solution run down the plate for about ten seconds.

In the final step, put the chromatoplate on a hot plate. On drying, the colour gradually develops.

(Frente do solvente)

Mancha principal de rifampicina

Mancha principal de etambutol

(Linha de base)

Caso a detecção através de luz ultravioleta ou de vapor de iodo não seja efectiva, deve fazer com que as manchas se tornem visíveis expondo-as a agentes corantes mais específicos. Se tiver uma câmara extractora com exaustão (hotte de laboratório químico), pode dissolver e aplicar o agente corante através de pulverização. Se não tiver disponível uma câmara extractora com exaustão pode, como alternativa, mergulhar as placas na solução reagente. É menos eficaz e requer algum treino, de modo a evitar o risco de deformação ou eliminação das manchas das amostras. Neste caso, as manchas de etambutol são reveladas na placa com uma solução reagente de ninhidrina.

Pode usar uma proveta para depositar a solução corante. Em primeiro lugar, mergulhe rapidamente a placa de CCF revelada na solução reagente. Assegure-se de que a zona onde é provável que as manchas apareçam está completamente molhada. De seguida, retire de imediato a placa cromatográfica da solução. Este procedimento não deve ultrapassar um segundo, de forma a evitar alterações nas manchas.

Após remover a placa de CCF da solução corante, coloque a parte de baixo da placa em papel absorvente e deixe o excedente da solução reagente escorrer pela placa durante cerca de dez segundos.

Por fim, coloque a placa cromatográfica sobre uma placa de aquecimento. Durante o processo de secagem a cor das manchas vai aparecendo gradualmente.

5.8 Chromatoplate reading

There is a strong evidence that the drugs in the test and standard solutions are identical if the principal spots of both samples show the same travel distance. Additional confirmation can be derived from similarities in spot colour, size, intensities, shape and accompanying satellite spots. These observations must be made for each method of detection, for example with UV light and different colouring agents. In addition, fixed-dose combination medicines should show two, three or even four different spots for each active ingredient claimed on the label. After this verification of drug identity, the spot sizes and intensities are then further compared for a semi-quantitative reading in order to verify the label claim on drug content.

Solvent front

Principal spot for sulfamethoxazole

Principal spot for trimethoprim

Origin line

Differences in spot size and intensity represent differences in drug concentrations. Here, the sample spot on run number 3 fails to meet the size and intensity of the reference spots on run number 1 and 4 representing the higher (100%) and lower (80%) standard, respectively. Failing to meet this range of drug concentrations means that the product fails to meet the label claim on potency. Should there be no spot at all, then the medicines under investigation will contain no active ingredient whatsoever.

Differences in travel distances indicate that the test solution contains a different drug. Here, the sample spot on run number 2 contains no sulfamethoxazole and no trimethoprim. Its travel distance completely differs from the reference spots on run number 1 and 4, respectively.

5.8 Leitura da placa cromatográfica

Há elevada probabilidade de os fármacos usados neste teste e as soluções padrão serem idênticos, se as manchas principais de ambas as amostras apresentarem a mesma distância percorrida. Tal pode ser ainda confirmado através das semelhanças na cor, tamanho, intensidade e forma das manchas e através das manchas secundárias correspondentes. Devem efectuar-se estas observações para cada método de detecção como, por exemplo, com luz ultravioleta e os diferentes agentes corantes. Os medicamentos com combinações de fármacos em doses fixas devem, ainda, evidenciar duas, três ou, até mesmo, quatro manchas correspondentes aos princípios activos mencionados no rótulo. Após verificar a identidade do fármaco, os tamanhos e intensidades das manchas são comparados numa leitura semi-quantitativa para verificar a veracidade do rótulo acerca da constituição do medicamento.

Frente do solvente

Mancha principal para o sulfametoxazol

Mancha principal para o trimetoprim

Linha de base

As diferenças no tamanho e intensidade das manchas representam diferenças nas concentrações dos fármacos. Neste teste, a mancha da amostra na corrida número 3 não corresponde ao tamanho e intensidade das manchas de referência nas corridas números 1 e 4, que representam o padrão superior (100%) e o inferior (80%), respectivamente. Não havendo coincidência com esta amplitude de concentração do fármaco, isso significa que o produto não tem a dosagem mencionada no rótulo. Se não aparecer nenhuma mancha, então os medicamentos sujeitos a análise não contêm quaisquer ingredientes activos.

As diferenças nas distâncias percorridas indicam que a solução de teste contém um fármaco diferente. Neste ensaio, a mancha da amostra na corrida número 2 não contém sulfametoxazol nem trimetoprim. A sua distância percorrida é completamente diferente da das manchas de referência nas corridas números 1 e 4, respectivamente.

5.9 Relative Retention Factor

As the absolute travel distance of the same drug expressed in millimetres varies between different chromatoplates, the relative retention factor, or in short Rf-value, expressing travel distances in a percentage value has been invented. This helps in comparing readings among plates developed at different time points and in different labs under different influencing factors, for example changing temperature and humidity. Samples failing to meet the travel distance of the reference standard are containing a wrong product and are not meeting the label claim on drug identity.

Relative retention factors (Rf-values) are determined as follows: Instantly mark the solvent front when removing the chromatoplate from the developing tank. Dry off all residual solvent and detect the spots. Mark the centre of the spots and measure both travel distances, the one from the solvent front and the one from the spots, using a graduated ruler. Starting point, in each case, is the origin line.

Solvent front

Principal spot

Origin line

$$\text{Rf test solution} = \frac{\text{Distance moved by spot}}{\text{Distance moved by solvent front}}$$

$$\text{Rf test solution} = \frac{33 \text{ mm}}{77 \text{ mm}} = 0,43$$

$$\text{Rf test solution in percent} = 0,43 \times 100\% = 43\%$$

Hence, the sample spot moved 43% of the total possible travel distance between origin line and solvent front.

Divide the distance moved by the sample spot by the total travel distance moved by the solvent front. The result obtained is the Rf-value, which may be expressed in percentage when multiplied by 100. Consult the picture above to see how the measurements are taken.

5.9 Factor de retenção relativa

Como a distância percorrida absoluta do mesmo fármaco, expressa em milímetros, varia de uma placa cromatográfica para outra diferente, surgiu o factor de retenção relativa ou, abreviando, o Rf, que expressa as distâncias percorridas usando percentagens. Isto ajuda a comparar as leituras entre as placas eluídas em alturas diferentes e em laboratórios diferentes, sob a influência de factores variáveis como, por exemplo, a temperatura e os níveis de humidade. As amostras que não apresentem a mesma distância percorrida que o padrão de referência não contêm o produto correcto e não correspondem ao que está no rótulo quanto à identidade do fármaco.

Os factores de retenção relativa (Rf) são determinados da seguinte forma: Marque imediatamente a frente do solvente quando remover a placa cromatográfica do tanque de eluição. Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem e revele as manchas. Marque o centro das manchas e meça as duas distâncias percorridas, a da frente solvente e a das manchas, usando uma régua graduada. O ponto de partida, para cada caso, é a linha de base.

Frente do solvente

Mancha principal

Linha de base

$$\text{Solução de teste Rf} = \frac{\text{Distância percorrida pela mancha}}{\text{Distância percorrida pela frente do solvente}}$$

$$\text{Solução de teste Rf} = \frac{33 \text{ mm}}{77 \text{ mm}} = 0,43$$

$$\text{Solução de teste Rf em percentagem} = 0,43 \times 100\% = 43\%$$

Assim, a mancha da amostra percorreu 43% da distância percorrida total possível entre a linha de base e a frente do solvente.

Divida a distância percorrida pela mancha amostra pela distância percorrida pela frente do solvente. O resultado obtido é o valor de Rf, que pode ser expresso em percentagem se multiplicado por 100. Consulte a imagem anterior para ver como se faz a medição.

5.10 TLC handling and sample errors

Due to accidental handling faults on spotting and other reasons beyond control, relative retention factors (Rf-values) might slightly differ for the same drug on the same chromatoplate. Comparing Rf-values obtained from multiple TLC experiments for the same drug are allowing the calculation of these potential sample errors, a better evaluation of readings and finally a sound decision on failed or passed samples.

$$\text{Rf sample error} = \frac{(\text{Rf standard solution} - \text{Rf test solution})}{\text{Rf standard solution}} \times 100\%$$

$$\text{Rf sample error} = \frac{(0.55 - 0.53)}{0.55} \times 100\% = 3.6\%$$

Rule 1: When Rf sample error is 5% or less, the sample can be considered as passed.

Rule 2: When Rf sample error is 10% or more, the sample can be considered as failed.

Rule 3: When Rf sample error is between 5% and 10%, the sample can be considered as doubtful.

Here, the Rf-value reading for the standard solution is 0.55 and that for the test solution 0.53 leading to an acceptable sample error of 3.6%. Based on the typical Rf-value and sample error analysis, some broad rules can be applied to interpret chromatoplate readings.

Solvent front

Origin line

passed

doubtful

+10% deviation

+5% deviation

0% deviation

-5% deviation

-10% deviation

If the TLC chamber was not well saturated, or if the saturation has been disturbed, the spots may not be horizontal and this could give high Rf sample errors. These and other TLC handling errors explain that the more data points are available the more reliable are the results. Always make duplicate chromatoplates and compare the Rf-values of both runs. Make a third assay under more optimal conditions to delete any doubts.

5.10 Execução das CCF e erros das amostras

Devido a erros de manuseamento acidentais durante a aplicação das amostras e a outras variáveis impossíveis de controlar, os factores de retenção relativa (Rf) podem variar ligeiramente, para o mesmo produto e na mesma placa de cromatografia. A comparação destes valores de Rf obtidos através de várias experiências de CCF para o mesmo fármaco permite o cálculo destes potenciais erros de amostragem, uma melhor avaliação das leituras e, por último, uma decisão solidamente fundamentada quanto à aprovação ou rejeição das amostras.

$$\text{Erro no valor de Rf da amostra} = \frac{(\text{Rf da solução padrão} - \text{Rf da solução de teste})}{\text{Rf da solução padrão}} \times 100\%$$

$$\text{Erro no valor de Rf da amostra} = \frac{(0.55 - 0.53)}{0.55} \times 100\% = 3.6\%$$

Regra 1: Quando o erro no valor de Rf da amostra é 5% ou inferior, pode considerar-se que a amostra está aceitável.

Regra 2: Quando o erro no valor de Rf da amostra é 10% ou superior, pode considerar-se que a amostra não está aceitável.

Regra 3: Quando o erro no valor de Rf da amostra vai de 5% a 10%, pode considerar-se que a amostra é duvidosa.

Neste caso, a leitura do valor de Rf da solução padrão é 0,55 e a da solução de teste é de 0,53, o que indica, para esta amostra, um erro aceitável de 3,6%. Com base no valor de Rf típico e numa análise simples do erro, podem aplicar-se algumas regras gerais na interpretação das leituras das placas cromatográficas.

Frente do solvente

Linha de base

aprovado

duvidoso

desvio de +10%

desvio de +5%

linha central 0%

desvio de -5%

desvio de -10%

Se a câmara de CCF não tiver sido bem saturada, ou se a saturação tiver sido interrompida, as manchas podem não ser horizontais e isto pode originar erros elevados no valor de Rf da amostra. Face a estes e outros erros no manuseamento das CCF, quanto maior o número de leituras efectuado, mais fiáveis serão os resultados. Faça sempre as placas cromatográficas em duplicado e compare os valores de Rf de ambas as corridas. Faça um terceiro teste em condições mais próximas do ideal, para eliminar quais quer dúvidas.

Proper and poor sample application and their effect on spot size and shape.

Run No. 1: Properly applied sample causing perfectly round spots.

Run No. 2: When applying too much sample the overloading may cause 'tear drops' or 'tailing'. Tailing can be observed also when spots made from aqueous sample solutions are not dried perfectly on a hot plate before chromatoplate development.

Run No. 3: Applying sample solutions drop-by-drop may cause twisted or even twin spots. Scratching of chromatoplates with micropipettes during sample application will have similar effects.

Solvent front

Origin line

5.11 Cleaning and disposal

Thoroughly clean all straight pipettes and all other glassware and laboratory equipment after use. Dispose of all sample solutions and rinse the empty bottles with water employing sufficient detergent. Finally, if available, rinse all glassware with deionised water prior to drying thus avoiding scum and stains. Place all pipettes and the other glass containers upside down into the rack supplied thus facilitating the drying process.

Very dirty or blocked straight pipettes are either soaked in appropriate extraction solvent, hot detergent solution, acetic acid solution 50% or hydrogen peroxide solution 10% prior to their final cleaning.

Use dedicated waste containers for the disposal of used reagents, test solutions and solvents. For further disposal, follow local rules.

Aplicação correcta e incorrecta das amostras e suas consequências no tamanho e forma das manchas obtidas.

1ª corrida: Amostra aplicada correctamente, dando origem a manchas circulares perfeitas.

2ª corrida: Se se aplicar uma quantidade excessiva de amostra, o excesso de quantidade pode originar manchas arrastadas ou com formato de lágrima. O arrastamento pode também ocorrer quando as aplicações feitas a partir de soluções de amostra aquosas não são totalmente secas numa placa de aquecimento antes da revelação da placa cromatográfica.

3ª corrida: A aplicação das amostras gota a gota pode originar manchas deformadas ou até duplas. Se se danificar as placas cromatográficas com as pipetas com microcapilares durante a aplicação das amostras, serão observados efeitos semelhantes.

Frente do solvente

Linha de base

5.11 Limpeza e eliminação

Limpe cuidadosamente todas as pipetas graduadas e todo o material de vidro e equipamento de laboratório após o seu uso. Elimine todas as soluções de amostra e lave os frascos vazios com água, utilizando detergente suficiente. Por fim e se for possível, lave todos os utensílios de vidro com água desionizada, antes de os secar, evitando assim que fiquem com espuma ou nódoas. Coloque todas as pipetas e todos os outros recipientes de vidro, voltados para baixo, no suporte fornecido, facilitando assim o processo de secagem.

Se as pipetas estiverem muito sujas ou obstruídas, encha-as com solvente de extracção apropriado, solução de detergente quente, solução de ácido acético a 50% ou solução de peróxido de hidrogénio a 10%, antes da sua limpeza final.

Use contentores do lixo apropriados para eliminar os reagentes usados, soluções de teste e solventes. Siga as regras locais quanto ao tratamento ou eliminação desses contentores.

6.1 Acetylsalicylic Acid (Aspirin)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 100 - 500 mg of acetylsalicylic acid.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release aspirin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Acetylsalicylic acid is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Ethyl acetate
- 20) Glacial acetic acid
- 21) Methanol
- 22) Secondary reference standard, for example, acetylsalicylic acid 300 mg tablets

6.1 Ácido Acetilsalicílico (Aspirina)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPEÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 100 a 500 mg de ácido acetilsalicílico.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

O ácido acetilsalicílico é extraído de comprimidos e cápsulas com metanol e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetato de etilo
- 20) Ácido acético glacial
- 21) Metanol
- 22) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de ácido acetilsalicílico de 300 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 300 mg of acetylsalicylic acid. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 30 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Aspirin Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as "*Aspirin Working Standard Solution 100%*".

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of acetylsalicylic acid.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Aspirin Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of acetylsalicylic acid as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF ASPIRIN PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

300 MG OF ASPIRIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 30 ml of methanol using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

500 MG OF ASPIRIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Aspirin Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 300 mg de ácido acetilsalicílico. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 30 ml de metanol, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 10 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Aspirina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução stock do padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Aspirina a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho, com concentração limite superior, representa um medicamento de alta qualidade, que contém 100% de ácido acetilsalicílico.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução stock do padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Aspirina a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de ácido acetilsalicílico, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 100 MG DE ASPIRINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

300 MG DE ASPIRINA POR UNIDADE

Extraia com 30 ml de metanol o pó obtido de um comprimido ou cápsula amostra, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

500 MG DE ASPIRINA POR UNIDADE

Extraia, com 50 ml de metanol, o pó obtido de um comprimido ou cápsula amostra, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 10 mg de fármaco por ml e ser rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Aspirina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Aspirin Working Sample Solution*'.

The expected concentration of aspirin in this working sample solution is 2.5 mg per ml and should match the concentration of aspirin of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 20 ml of ethyl acetate and 5 ml of methanol into the jar being used as TLC developing chamber. Add 10 drops of glacial acetic acid, close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate in the dark under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Aspirina*”.

Estima-se que a concentração de aspirina nesta solução amostra de trabalho seja de 2,5 mg por ml, igualando a concentração de aspirina na solução padrão, com a concentração limite superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da página seguinte, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se aplicar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 20 ml de acetato de etilo e 5 ml de metanol, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Adicione 10 gotas de ácido acético glacial, feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos, para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a no escuro, sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da identidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia, após a marcação com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Aspirin's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Aspirin's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent spot)

Principal spot

Satellite spot indicating salicylic acid

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.55 indicates the presence of acetylsalicylic acid in the test solution. Sometimes, traces of salicylic acid might emerge at a travel distance of about 0.35 (greyish blue spot). An increase of the salicylic acid spot would point at drug degradation especially when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line

XIII.OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all aspirin spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. The reaction is weak and might take some time as acetylsalicylic acid performs poorly on this test. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The aspirin spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior da aspirina, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da aspirina, representando 80% do fármaco.

(Mancha do solvente)

Mancha principal

Mancha secundária indicando ácido salicílico

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta nítida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,55 indica a presença de ácido acetilsalicílico na solução de teste. Por vezes, uma segunda mancha pouco nítida poderá surgir a uma distância percorrida de cerca de 0,35, indicando a presença de ácido salicílico (mancha azul-esverdeada). Um aumento da mancha de ácido salicílico indica a degradação do fármaco, especialmente quando associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes formulações dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

Todas as manchas anteriormente observadas a 254 nm tornam-se agora amarelo-acastanhadas quando a placa cromatográfica é exposta ao vapor de iodo. A reacção é fraca e pode levar algum tempo a manifestar-se, pois o ácido acetilsalicílico não é muito reactivo neste teste. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de aspirina no cromatograma obtido a partir da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena, até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.2 Aminophylline

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 100 or 200 mg of aminophylline (theophylline hemiethylenediamine) hydrate equivalent to about 80 or 160 mg of anhydrous theophylline, respectively. Other strengths are known to exist.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release aminophylline tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Aminophylline is extracted from tablets and capsules with water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) UV light of 254 nm
- 17) Acetone
- 18) Toluene
- 19) W a t e r
- 20) Secondary reference standard, for example, aminophylline 100 mg tablets

6.2 Aminofilina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 100 ou 200 mg de aminofilina-hidrato (teofilina-hemietilenodiamina), equivalente a 80 ou 160 mg de teofilina anidra, respectivamente. Sabe-se que existem outras dosagens.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de aminofilina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A aminofilina é extraída de comprimidos e cápsulas com água e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Luz ultravioleta de 254 nm
- 17) Acetona
- 18) Tolueno
- 19) Água
- 20) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de aminofilina de 100 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 100 mg of aminophylline. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 20 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Aminophylline Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 2 ml of water. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Aminophylline Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of aminophylline.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of water. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Aminophylline Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of aminophylline as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF AMINOPHYLLINE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 20 ml of water using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

200 MG OF AMINOPHYLLINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 40 ml of water using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Aminophylline Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 100 mg de aminofilina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar em pó, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 20 ml de água, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como «*Solução Stock do Padrão de Aminofilina*». Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 2 ml da solução stock do padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de água. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Aminofilina a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de aminofilina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 2 ml da solução stock do padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de água. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Aminofilina a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de aminofilina, o que é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 250 MG DE AMINOFILINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 20 ml de água, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

200 MG DE AMINOFILINA POR UNIDADE

Extraia, com 40 ml de água, o pó obtido de um comprimido ou cápsula amostra, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 5 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock de Amostra de Aminofilina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 2 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 2 ml of water. Close and shake the vial and label as '*Aminophylline Working Sample Solution*'.

The expected concentration of aminophylline in this working sample solution is 2.5 mg per ml and should match the concentration of aminophylline of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 μ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 14 ml of acetone and 7 ml of toluene into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 2 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de água. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Aminofilina*”.

Estima-se que a concentração de aminofilina nesta solução amostra de trabalho seja de 2,5 mg por ml, igualando a concentração de aminofilina na solução padrão, com a concentração limite superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se aplicar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher as pipetas microcapilares pode demorar algum tempo, quando se utilizam soluções de amostra aquosas. Para evitar que os resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 14 ml de acetona e 7 ml de tolueno, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de revelação de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos, para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos. Feche o frasco e revele a placa cromatográfica antes que a frente solvente cubra três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente solvente e deixe que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Aminophylline's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Aminophylline's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.30 indicates the presence of aminophylline in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or aminophylline degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The aminophylline spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior da aminofilina, representando 100% do fármaco.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da aminofilina, representando 80% do fármaco.

(Frente do solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,30 indica a presença de aminofilina na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste indicariam a presença de outros fármacos ou a degradação da aminofilina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de aminofilina no cromatograma obtido a partir da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.3 Amodiaquine (as free base and hydrochloride)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 153 or 200 mg of amodiaquine free base or 200 mg of amodiaquine hydrochloride that is again equivalent to a 153 mg of amodiaquine free base. Other strengths are known to exist.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release amodiaquine tablets and capsules, but not chewable and sugar coated tablets, must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

- Amodiaquine free base is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. Methanol may be replaced by hydrochloric acid solution 3.6%.
- Amodiaquine hydrochloride is extracted with water.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1) Pestle

2) Aluminium foil

3) Funnel

4) Label tape

5) Marker pen

6) Pencil

7) 10-ml vials

8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)

9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)

10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm

11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)

12) TLC developing chamber (500-ml jar)

13) Hot plate

14) Filter paper

15) Pair of scissors

16) UV light of 254 nm

17) Ethyl acetate

18) Methanol

19) Water

20) Ammonia solution 25%

21) Hydrochloric acid solution 36%

22) Secondary reference standard, for example, amodiaquine hydrochloride 200 mg tablets

6.3 Amodiaquina (como base livre e cloridrato)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 153 ou 200 mg de amodiaquina como base livre, ou 200 mg de cloridrato de amodiaquina, equivalente a 153 mg de amodiaquina como base livre. Sabe-se que existem outras dosagens.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de amodiaquina de libertação rápida mas não os comprimidos mastigáveis e os revestidos de açúcar, devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

- A amodiaquina na forma de base livre é extraída dos comprimidos e cápsulas com metanol e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência. O metanol pode ser substituído por uma solução de ácido clorídrico (3,6%).
- O cloridrato de amodiaquina é extraído com água.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Luz ultravioleta de 254 nm
- 17) Acetato de etilo
- 18) Metanol
- 19) Água
- 20) Solução de amoníaco a 25%
- 21) Solução de ácido clorídrico a 36%
- 22) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de cloridrato de amodiaquina de 200 mg.

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 200 mg of amodiaquine hydrochloride. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 100-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 40 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of amodiaquine hydrochloride or about 3.8 mg of amodiaquine free base per ml and be labelled as '*Amodiaquine Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.625 mg of amodiaquine hydrochloride or about 0.48 mg of amodiaquine free base per ml and be labelled as '*Amodiaquine Working Standard Solution 100%*'. This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of amodiaquine.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.5 mg of amodiaquine hydrochloride or about 0.38 mg of amodiaquine free base per ml and be labelled as '*Amodiaquine Working Standard Solution 80%*'. This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of amodiaquine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 153 MG OF AMODIAQUINE FREE BASE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 40-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 40 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

200 MG OF AMODIAQUINE FREE BASE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 52.3 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

200 MG OF AMODIAQUINE HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 40 ml of water using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of amodiaquine hydrochloride or about 3.8 mg of amodiaquine free base per ml and be labelled as '*Amodiaquine Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 200 mg de cloridrato de amodiaquina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 100 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 40 ml de água, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 5 mg de cloridrato de amodiaquina ou cerca de 3,8 mg de amodiaquina como base livre, por ml, e ser rotulada como «*Solução Stock do Padrão de Amodiaquina*». Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução stock do padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 0,625 mg de cloridrato de amodiaquina ou cerca de 0,48 mg de amodiaquina como base livre, por ml, e ser rotulada como «*Solução Padrão de Trabalho de Amodiaquina a 100%*». Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade, que contém 100% de amodiaquina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução stock do padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 0,5 mg de cloridrato de amodiaquina ou cerca de 0,38 mg de amodiaquina como base livre, por ml, e ser rotulada como «*Solução Padrão de Trabalho de Amodiaquina a 80%*». Esta solução padrão com concentração limite inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de amodiaquina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 153 MG DE AMODIAQUINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extração, adicione 40 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

200 MG DE AMODIAQUINA NA FORMA DE BASE LIVRE POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 52,3 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

200 MG DE CLORIDRATO DE AMODIAQUINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 40 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra produzidas devem, no final do procedimento, conter 5 mg de cloridrato de amodiaquina ou cerca de 3,8 mg de amodiaquina como base livre, por ml, e serem rotuladas como «*Solução Stock da Amostra de Amodiaquina*». Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Amodiaquine Working Sample Solution*'.

The expected concentration of amodiaquine hydrochloride in this working sample solution is 0.625 mg per ml and that of amodiaquine free base about 0.48 mg per ml and should match the concentration of amodiaquine of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 20 ml of methanol, 5 ml of ethyl acetate and 0.5 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução stock de amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Amodiaquina*”.

Estima-se que a concentração de cloridrato de amodiaquina nesta solução amostra de trabalho seja de 0,625 mg por ml e a de amodiaquina como base livre de cerca 0,48 mg por ml. Deve ser igual à concentração de amodiaquina na solução padrão, com a concentração limite superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se aplicar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher as pipetas microcapilares pode demorar algum tempo, quando se utilizam soluções de amostra aquosas. Para evitar que restos de água alastrem as manchas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da revelação da placa cromatográfica.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 20 ml de metanol, 5 ml de acetato de etilo e 0,5 ml da solução concentrada de amoníaco, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de revelação de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos, para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a com luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Amodiaquine's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Amodiaquine's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Amodiaquine's principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.72 indicates the presence of amodiaquine in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or amodiaquine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The amodiaquine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior da amodiaquina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da amodiaquina, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal de amodiaquina

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,72 indica a presença de amodiaquina na solução de teste. Manchas nítidas adicionais formadas pela solução de teste poderiam indicar a presença de outros medicamentos ou a degradação da amodiaquina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de amodiaquina no cromatograma obtido a partir da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.4 Amoxicillin

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule contains amoxicillin or amoxicillin trihydrate usually in dosage strengths of 250 and 500 mg of anhydrous amoxicillin. Other strengths are known to exist. Frequently, amoxicillin comes as powder for the preparation of oral suspensions.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release amoxicillin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Amoxicillin is extracted from tablets and capsules with acidified aqueous acetone solution and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm and 366 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Hydrochloric acid solution 36%
- 20) Acetone
- 21) Ethyl acetate
- 22) Glacial acetic acid
- 23) W a t e r
- 24) Secondary reference standard, for example, amoxicillin 500 mg tablets

6.4 Amoxicilina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula contém amoxicilina ou amoxicilina tri-hidratada, normalmente em doses de 250 e 500 mg de amoxicilina anidra. Sabe-se que existem outras dosagens. A amoxicilina apresenta-se, frequentemente, em pó para a preparação de suspensões orais.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de amoxicilina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A amoxicilina é extraída de comprimidos e cápsulas com uma solução aquosa acidificada de acetona e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm e 366 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Solução a 36% de ácido hidrolórico
- 20) Acetona
- 21) Acetato de etilo
- 22) Ácido acético glacial
- 23) Água
- 24) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de amoxicilina de 500 mg

III. PREPARATION OF EXTRACTION MEDIUM

Amoxicillin is difficult to dissolve and requires the use of acidified aqueous acetone. Pipette 2 ml of hydrochloric acid solution 36% into a 100-ml laboratory glass bottle. Dilute with 18 ml of water. Finally, add 80 ml of acetone, close the bottle and mix. Label the bottle accordingly. In extremely hot climates, it is an advantage to cool off the extraction medium below ambient temperature before use thus reducing the degradation of amoxicillin in solution.

IV. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 500 mg of amoxicillin. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 25 ml of acidified aqueous acetone solution using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 20 mg of total drug per ml and be labelled as '*Amoxicillin Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of acidified aqueous acetone solution. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Amoxicillin Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of amoxicillin.

VI. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of acidified aqueous acetone solution. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Amoxicillin Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of amoxicillin as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VII. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF AMOXICILLIN PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 12.5 ml of acidified aqueous acetone solution using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

III. PREPARAÇÃO DO MEIO DE EXTRACÇÃO

É difícil dissolver a amoxicilina, o que requer o uso de uma solução aquosa de acetona acidificada. Transfira, com uma pipeta, 2 ml da solução a 36% de ácido clorídrico para um frasco de vidro de laboratório de 100ml. Dilua-a com 18 ml de água. Por fim, adicione 80 ml de acetona, feche o recipiente e agite. Rotule o recipiente, indicando o conteúdo. Em climas com temperaturas extremamente elevadas, deve arrefecer o meio de extracção a temperaturas inferiores à temperatura ambiente, de modo a reduzir a degradação da amoxicilina em solução.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 500 mg de amoxicilina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Despeje, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 25 ml da solução aquosa de acetona acidificada, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 20 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Amoxicilina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml da solução aquosa de acetona acidificada. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Amoxicilina a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho, com concentração limite superior, representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de amoxicilina.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml da solução aquosa de acetona acidificada. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Amoxicilina a 80%*".

Esta solução padrão de trabalho, com concentração limite inferior, consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de amoxicilina, como referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 250 MG DE AMOXICILINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 12,5 ml da solução aquosa de acetona acidificada, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

500 MG OF AMOXICILLIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 25 ml of acidified aqueous acetone solution using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 20 mg of total drug per ml and be labelled as '*Amoxicillin Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

VIII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of acidified aqueous acetone solution. Close and shake the vial and label as '*Amoxicillin Working Sample Solution*'.

The expected concentration of amoxicillin in this working sample solution is 2.5 mg per ml and should match the concentration of amoxicillin of the higher working standard solution produced above.

IX. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing and other deleterious effects, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

X. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of ethyl acetate into the jar being used as TLC developing chamber. Add 5 ml of glacial acetic acid and 5 ml of water. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 30 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

XI. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate in the dark under UV light of 366 nm using the battery-driven lamp supplied. The dryer the plate the better the readings. Use this method of detection for identification purposes only. For drug content verification, observe the plate at daylight after iodine staining.

500 MG DE AMOXICILINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido de um comprimido ou de uma cápsula amostra, com 25 ml da solução aquosa de acetona acidificada, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções stock de amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 20 mg por ml de fármaco e serem rotuladas como “*Solução Stock de Amostra de Amoxicilina*”. Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VIII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml da solução aquosa de acetona acidificada. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Amoxicilina*”.

Estima-se que a concentração de amoxicilina nesta solução de amostra seja de 2,5 mg por ml, igualando a concentração de amoxicilina na solução padrão, com a concentração limite superior, preparada anteriormente.

IX. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da página seguinte, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se aplicar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher as pipetas microcapilares pode demorar algum tempo, quando se utilizam soluções de amostra aquosas. Para evitar que restos de água alastrem as manchas ou provoquem outros efeitos indesejáveis, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da revelação da placa cromatográfica.

X. ELUIÇÃO

Transfira 15 ml de acetato de etilo, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Adicione 5 ml de ácido acético glacial e 5 ml de água. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos, para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 30 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

XI. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a no escuro, sob luz ultravioleta de 366 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Quanto mais seca a placa estiver, melhor a sua leitura. Use este método de revelação apenas para efeitos de identificação. Para verificação adicional da autenticidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia após a marcação com iodo.

XII. CHROMATOPLATE OBSERVED AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

Run No.1: Amoxicillin's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Amoxicillin's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

Lower satellite spot

(Origin line)

XIII. OBSERVATIONS MADE AT 366 NM

The presence of amoxicillin is indicated by two main spots with an intense blue fluorescence, the principal one being in the front with a travel distance of about 0.32 followed by some smaller satellite spots, the lowest having a retention factor of about 0.14. The entire pattern of spots may well be regarded as amoxicillin's fingerprint serving the verification of identity. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIV. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all spots already observed at 366 nm are now turning yellowish brown, however, both, the principle and lower satellite spot being pronounced most. Use the principle spot at a travel distance of about 0.32 in order to verify the product's drug content. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

All spots in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XII. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA À LUZ DO DIA APÓS A MARCAÇÃO COM IODO

1ª corrida: Concentração limite superior da amoxicilina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da amoxicilina, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

Mancha secundária mais baixa

(Linha de base)

XIII. OBSERVAÇÃO A 366 NM

Duas manchas principais com fluorescência azul intensa indicam a presença de amoxicilina, sendo que a mancha principal se encontra à frente com uma distância percorrida de cerca de 0,32, seguida de algumas manchas secundárias menores. De entre estas, a mancha que migrou menos apresenta um factor de retenção de cerca de 0,14. Todo o padrão de manchas pode ser tido em conta como a impressão digital da amoxicilina, servindo como verificador de identidade. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIV. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS A MARCAÇÃO COM IODO

Ao expor a placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas anteriormente observadas a 366 nm tornam-se agora amarelo-acastanhadas, embora quer a mancha principal, quer a mancha secundária que migrou menos, se evidenciem mais. Use a mancha principal, localizada a uma distância percorrida de 0,32, para verificar a quantidade de fármaco contida no medicamento. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar, seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Todas as manchas no cromatograma obtido a partir da solução de teste devem corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.5 Ampicillin

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule contains ampicillin or ampicillin trihydrate usually in dosage strengths of 250 and 500 mg of anhydrous ampicillin. Other strengths are known to exist.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release ampicillin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Ampicillin is extracted from tablets and capsules with acidified aqueous acetone solution and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm and 366 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Hydrochloric acid solution 36%
- 20) Acetone
- 21) Ethyl acetate
- 22) Glacial acetic acid
- 23) Water
- 24) Secondary reference standard, for example, ampicillin 500 mg tablets

6.5 Ampicilina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula contém ampicilina ou ampicilina tri-hidratada, normalmente em doses de 250 e 500 mg de ampicilina anidra. Sabe-se que existem outras dosagens.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de ampicilina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A ampicilina é extraída de comprimidos e cápsulas com solução aquosa acidificada de acetona e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm e 366 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Solução a 36% de ácido clorídrico
- 20) Acetona
- 21) Acetato de etilo
- 22) Ácido acético glacial
- 23) Água
- 24) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de ampicilina de 500 mg

III. PREPARATION OF EXTRACTION MEDIUM

Ampicillin is difficult to dissolve and requires the use of acidified aqueous acetone. Pipette 2 ml of hydrochloric acid solution 36% into a 100-ml laboratory glass bottle. Dilute with 18 ml of water. Finally, add 80 ml of acetone, close the bottle and mix. Label the bottle accordingly. In extremely hot climates, it is an advantage to cool off the extraction medium below ambient temperature before use thus reducing the degradation of ampicillin in solution.

IV. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 500 mg of ampicillin. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 25 ml of acidified aqueous acetone solution using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 20 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ampicillin Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of acidified aqueous acetone solution. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ampicillin Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of ampicillin.

VI. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of acidified aqueous acetone solution. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ampicillin Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of ampicillin as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VII. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF AMPICILLIN PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 12.5 ml of acidified aqueous acetone solution using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

III. PREPARAÇÃO DO MEIO DE EXTRACÇÃO

É difícil dissolver a ampicilina, o que requer o uso de uma solução aquosa de acetona acidificada. Transfira, com uma pipeta, 2 ml da solução a 36% de ácido clorídrico para um frasco de vidro de laboratório de 100ml. Dilua-a com 18 ml de água. Por fim, adicione 80 ml de acetona, feche o recipiente e agite. Rotule o recipiente, indicando o conteúdo. Em climas com temperaturas extremamente elevadas, deve arrefecer o meio de extracção a temperaturas inferiores à temperatura ambiente, de modo a reduzir a degradação da ampicilina em solução.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 500 mg de ampicilina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar um pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 25 ml da solução aquosa de acetona acidificada, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 20 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Ampicilina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml da solução aquosa de acetona acidificada. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Ampicilina a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho, com concentração limite superior, representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de ampicilina.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml da solução aquosa de acetona acidificada. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Amipicilina a 80%*".

Esta solução padrão, com concentração limite inferior, representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de ampicilina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DA AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 250 MG DE AMPICILINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 12,5 ml da solução aquosa de acetona acidificada, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

500 MG OF AMPICILLIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 25 ml of acidified aqueous acetone solution using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 20 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ampicillin Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

VIII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of acidified aqueous acetone solution. Close and shake the vial and label as '*Ampicillin Working Sample Solution*'.

The expected concentration of ampicillin in this working sample solution is 2.5 mg per ml and should match the concentration of ampicillin of the higher working standard solution produced above.

IX. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing and other deleterious effects, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

X. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of ethyl acetate into the jar being used as TLC developing chamber. Add 5 ml of glacial acetic acid and 5 ml of water. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 30 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

XI. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate in the dark under UV light of 366 nm using the battery-driven lamp supplied. The dryer the plate the better the readings. Use this method of detection for identification purposes only. For drug content verification, observe the plate at daylight after iodine staining.

500 MG DE AMPICILINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula, com 25 ml da solução aquosa de acetona acidificada, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 20 mg por ml de fármaco na forma pura e serem rotuladas como “*Solução stock da Amostra de Ampicilina*”. Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VIII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml da solução aquosa de acetona acidificada. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de trabalho de Ampicilina*”.

Estima-se que a concentração de ampicilina nesta solução de amostra seja de 2,5 mg por ml, igualando a concentração de ampicilina na solução padrão, com a concentração superior, preparada anteriormente.

IX. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da página seguinte, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se aplicar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher as pipetas microcapilares pode demorar algum tempo, quando se utilizam soluções de amostra aquosas. Para evitar que restos de água alastrem as manchas ou provoquem outros efeitos indesejáveis, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da revelação da placa cromatográfica.

X. ELUIÇÃO

Transfira 15 ml de acetato de etilo, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Adicione 5 ml de ácido acético glacial e 5 ml de água. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos, para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 30 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

XI. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a no escuro, sob luz ultravioleta de 366 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Quanto mais seca a placa estiver, melhor será a sua leitura. Use este método de revelação apenas para efeitos de identificação. Para verificação adicional da identidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia, após a marcação com iodo.

XII. CHROMATOPLATE OBSERVED AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

Run No.1: Ampicillin's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Ampicillin's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

Lower satellite spot

(Origin line)

XIII. OBSERVATIONS MADE AT 366 NM

The presence of ampicillin is indicated by several blue fluorescence spots with different intensities and shades, the principal spot being in the front with a travel distance of about 0.37 followed by some smaller satellite spots, the lowest having a retention factor of about 0.16. The entire pattern of spots may well be regarded as ampicillin's fingerprint serving the verification of identity. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIV. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all spots already observed at 366 nm are now turning yellowish brown, however, both, the principle and lower satellite spot being pronounced most. Use the principle spot at a travel distance of about 0.37 in order to verify the product's drug content. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

All spots in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XII. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA À LUZ DO DIA APÓS A MARCAÇÃO COM IODO

1ª corrida: Concentração limite superior da ampicilina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da ampicilina, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

Mancha secundária mais baixa

(Linha de base)

XIII. OBSERVAÇÃO A 366 NM

Várias manchas de diferentes formas e intensidades indicam a presença de ampicilina através de uma fluorescência azul intensa, sendo que a mancha principal se encontra à frente com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,37, seguida de algumas manchas secundárias menores. De entre estas, a mais baixa apresenta um factor de retenção de cerca de 0,16. Todo o padrão de manchas pode ser tido em conta como a impressão digital da ampicilina, servindo como verificador de identidade. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIV. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS A MARCAÇÃO COM IODO

Ao expor a placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas que eram visíveis a 366 nm tornam-se agora amarelo-acastanhadas, embora quer a mancha principal, quer a mancha secundária situada mais abaixo, se evidenciem mais. Use a mancha principal, localizada a uma distância percorrida de 0,37, para verificar a quantidade de fármaco contida no medicamento. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Todas as manchas no cromatograma obtido a partir da solução de teste devem corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de detecção. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena, até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.6 Artemether (including fixed-dose combinations)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 50 mg of artemether. Other strengths are known to exist in particular in fixed-dose combinations with other antimalarial medicines, for example 20 mg of artemether combined with a 120 mg of lumefantrine.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release artemether tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It is a major defect if a drug product does not pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Artemether is extracted from tablets and capsules with acetone and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with lumefantrine, both compounds can be extracted and analysed simultaneously. For this, see also the lumefantrine test protocol on page 116.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) TLC dipping chamber (200-ml beaker)
- 19) Sulphuric acid solution 96%
- 20) Acetone
- 21) Ethyl acetate
- 22) Glacial acetic acid
- 23) Methanol
- 24) Toluene
- 25) Secondary reference standard, for example, artemether 50 mg tablets

6.6 Arteméter (incluindo produtos com combinações de doses fixas)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 50 mg de arteméter. Sabe-se que existem outras dosagens, particularmente em combinações de doses fixas com outros medicamentos antimaláricos, por exemplo 20 mg de arteméter combinado com 120 mg de lumefantrina.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos de arteméter de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

O arteméter é extraído de comprimidos e cápsulas com acetona e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência. Quando combinado com lumefantrina, ambos os compostos podem ser simultaneamente extraídos e analisados. Para isso, ver também o protocolo de teste da lumefantrina, na página 116.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de imersão da placa cromatográfica (proveta de 200 ml)
- 19) Ácido sulfúrico a 96%
- 20) Acetona
- 21) Acetato de etilo
- 22) Ácido acético glacial
- 23) Metanol
- 24) Tolueno
- 25) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de arteméter de 50 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 50 mg of arthemeter. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 25 ml of acetone solution using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 20 mg of total drug per ml and be labelled as '*Arthemeter Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

The arthemeter stock standard solution requires no further dilution. It already represents the final working concentration of 2 mg of total drug per ml. Just for more convenient handling, some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of arthemeter.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 4 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 1 ml of acetone. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.6 mg of total drug per ml and be labelled as '*Arthemeter Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of arthemeter as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 20 MG OF ARTHEMETER PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of acetone using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

50 MG OF ARTHEMETER PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 25 ml of acetone using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 2 mg of total drug per ml and be labelled as '*Arthemeter Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 50 mg de arteméter. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 25 ml de acetona, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 20 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Arteméter*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

A solução padrão de trabalho de arteméter não requer diluição adicional. Já contém a concentração final de trabalho de 2 mg de fármaco por ml. Para facilitar o manuseamento, pode transferir algum líquido sobrenadante para um frasco de 10 ml.

Esta solução padrão com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade, que contém 100% de arteméter.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 4 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 1 ml de acetona. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,6 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Arteméter a 80%*".

Esta solução padrão de eficácia inferior consiste num medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de arteméter, como referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 20 MG DE ARTEMÉTER POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de acetona, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte dos sólidos se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos que não se dissolveram se depositem no fundo do frasco.

50 MG OF ARTEMÉTER POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 25 ml de acetona, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra produzidas devem, no final do procedimento, conter 2 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock de Amostra de Arteméter*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Artemether stock sample solutions require no further dilution. They already represent the final working concentration of 2 mg of total drug per ml. If prepared from a high quality product, the sample solution should match the concentration of artemether of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 4 ml of ethyl acetate, 2 ml of glacial acetic acid and 18 ml of toluene into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection in case artemether is combined with lumefantrine.

For the detection of artemether, expose the TLC plate to the sulphuric acid staining solution. For this, mix a 190 ml of methanol with 10 ml of sulphuric acid solution 96%. Use the plastic beaker supplied to accommodate the staining solution. This will allow dipping the chromatoplate into the staining solution using a pair of tweezers. Instantly remove the plate from the solution and dry the back of the plate with paper tissue. Continue to dry off all staining solution on a hot plate and observe how the artemether spots are gradually becoming visible. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Note that this method of detection will make it impossible to observe other spots, for example lumefantrine, under UV light of 254 nm. Also note that the staining operation with sulphuric acid solution is very similar to that with ninhydrin pictured on page 26.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

As soluções amostra de arteméter não requerem diluição adicional. Já contêm a concentração final de trabalho de 2 mg de fármaco por ml. Se for preparada a partir de um produto de alta qualidade, a solução de amostra deve ser igual à concentração de arteméter na solução padrão de trabalho, com concentração superior, preparada anteriormente.

VIII. COLOCAÇÃO DA AMOSTRA

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se aplicar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 4 ml de acetato de etilo, 2 ml de ácido acético glacial e 18 ml de tolueno, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de revelação de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos, para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa de CCF contendo os compostos. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação no caso da combinação do arteméter com lumefantrina.

Para a revelação do arteméter exponha a placa de CCF à solução corante de ácido sulfúrico. Para fazer isso, misture 190 ml de metanol com 10 ml de solução de ácido sulfúrico a 96%. Use a proveta de plástico fornecida, para colocar a solução corante. Isto permitirá mergulhar a placa cromatográfica na solução corante, usando uma pinça. Remova imediatamente a placa da solução e seque a parte de trás da placa com papel absorvente. Faça com que toda a solução corante se evapore, usando uma placa de aquecimento e observe a forma como as manchas de arteméter se tornam gradualmente visíveis. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação. Tenha em conta que este método de detecção tornará impossível a observação de outras manchas, por exemplo manchas de lumefantrina, sob uma luz ultravioleta de 254 nm. Tenha também em conta que a operação de marcação com a solução de ácido sulfúrico é muito semelhante à realizada com ninhidrina, constante da página 26.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

Run No.1: Artemether's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Artemether's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Artemether's principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

Artemether stays invisible and no other spots should be detected unless the medicine under investigation is presented as a fixed-dose combination product containing also lumefantrine. In case lumefantrine is there, appropriate spots will become visible at a travel distance of about 0.16 (see page 119). Further strong spots generated by the test solution would point at other drugs.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER STAINING

A grey spot at a travel distance of about 0.56 indicates the presence of artemether in the test solution. No other spots should be visible even if artemether is combined with lumefantrine. Additional strong spots generated by the test solution would point at drug degradation especially when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots either travelling alongside the solvent front or emerging near or even on the origin line.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The artemether spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this

is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

1ª corrida: Concentração limite superior do arteméter, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior de eficácia do arteméter, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal de arteméter

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

O arteméter permanece invisível e não devem existir outras manchas, a não ser que o medicamento em análise seja um produto de combinação de dose fixa, contendo lumefantrina. No caso de conter lumefantrina, aparecerão manchas com uma distância percorrida de cerca de 0,16 (ver página 119). Se houver manchas nítidas adicionais, formadas pela solução de teste, isso indica a presença de outros fármacos.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO

Uma mancha cinzenta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,56 indica a presença de arteméter na solução de teste. Não devem existir mais manchas visíveis, mesmo se o arteméter estiver combinado com lumefantrina. Se houver manchas nítidas adicionais, formadas pela solução de teste, isso indica a degradação do fármaco, especialmente no caso de haver uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, quer ao longo da frente do solvente, quer perto da linha ou sobre esta.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de arteméter no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena, até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.6 Artesunate

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 50, 100 or 200 mg of artesunate.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release artesunate tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It is a major defect if a drug product does not pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Artesunate is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1) Pestle

2) Aluminium foil

3) Funnel

4) Label tape

5) Marker pen

6) Pencil

7) 10-ml vials

8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)

9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)

10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm

11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)

12) TLC developing chamber (500-ml jar)

13) Hot plate

14) Filter paper

15) Pair of scissors

16) Pair of tweezers

17) UV light of 254 nm

18) TLC dipping chamber (200-ml beaker)

19) Sulphuric acid solution 96%

20) Acetone

21) Ethyl acetate

22) Glacial acetic acid

23) Methanol

24) Secondary reference standard, for example, artesunate 50 mg tablets

6.6 Artesunato

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 50, 100 ou 200 mg de artesunato.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos de artesunato de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais do manual principal. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baratos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

O artesunato é extraído de comprimidos e cápsulas com metanol e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de imersão da placa cromatográfica (proveta de 200 ml)
- 19) Ácido sulfúrico a 96%
- 20) Acetona
- 21) Acetato de etilo
- 22) Ácido acético glacial
- 23) Metanol
- 24) Padrão

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 50 mg of artesunate. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 10 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Artesunate Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

The artesunate stock standard solution requires no further dilution. It already represents the final working concentration of 5 mg of total drug per ml. Just for more convenient handling, some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of artesunate.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 4 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 1 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 4 mg of total drug per ml and be labelled as '*Artesunate Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of artesunate as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 50 MG OF ARTESUNATE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

100 MG OF ARTESUNATE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 20 ml of methanol using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

200 MG OF ARTESUNATE PER UNIT

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Artesunate Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 50 mg de artesunato. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como «*Solução Stock do Padrão de Artesunato*». Prepare novas soluções para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

A solução padrão de trabalho de artesunato não requer diluição adicional. Já contém a concentração final de trabalho de 5 mg de fármaco por ml. Para facilitar o manuseamento, pode transferir algum líquido sobrenadante para um frasco de 10 ml.

Esta solução padrão com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade, que contém 100% de artesunato.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 4 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 1 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 4 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Artesunato a 80%*".

Esta solução padrão de concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de artesunato, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 50 MG DE ARTESUNATO POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

100 MG OF ARTESUNATO POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula, com 20 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

200 MG OF ARTESUNATO POR UNIDADE

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 5 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock de Amostra de Artesunato*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Artesunate stock sample solutions require no further dilution. They already represent the final working concentration of 5 mg of total drug per ml. If prepared from a high quality product, the sample solution should match the concentration of artesunate of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 μ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 18 ml of ethyl acetate, 4 ml of acetone and 0.1 ml of glacial acetic acid into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and expose the TLC plate to the sulphuric acid staining solution. For this, mix a 190 ml of methanol with 10 ml of sulphuric acid solution 96%. Use the plastic beaker supplied to accommodate the staining solution. This will allow dipping the chromatoplate into the staining solution using a pair of tweezers. Instantly remove the plate from the solution and dry the back of the plate with paper tissue. Continue to dry off all staining solution on a hot plate and observe how the artesunate spots are gradually becoming visible. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Note that the staining operation with sulphuric acid solution is very similar to that with ninhydrin pictured on page 26.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

As soluções amostra de artesunato não requerem diluição adicional. Já contêm a concentração final de trabalho de 5 mg de fármaco por ml. Se preparada a partir de um produto de alta qualidade, a solução de amostra deve ser igual à concentração de artesunato na solução padrão, de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando os com microcapilares fornecidos.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 18 ml de acetato de etilo, 4 ml de acetona e 0,1 ml de ácido acético glacial, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos, para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a eluição da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem e exponha a placa de CCF à solução corante de ácido sulfúrico. Para fazer isso, misture 190 ml de metanol com 10 ml de solução de ácido sulfúrico a 96%. Use a proveta de plástico fornecida, para colocar a solução corante. Isto permitirá mergulhar a placa cromatográfica na solução corante, usando uma pinça. Remova imediatamente a placa da solução e seque a parte de trás da placa com papel absorvente. Faça com que toda a solução corante se evapore, usando uma placa de aquecimento e observe a forma como as manchas de artesunato se tornam gradualmente visíveis. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação. Tenha também em conta que a operação de marcação com a solução de ácido sulfúrico é muito semelhante à realizada com ninidrina., constante da página 26.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED AFTER STAINING WITH SULPHURIC ACID AND HEAT

Solvent front

Principal spot

Origin line

Run No.1: Artesunate's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Artesunate's lower working limit representing 80% of total drug.

XII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER STAINING

A greyish brown spot at a travel distance of about 0.45 indicates the presence of artesunate in the test solution. No other spots should be visible. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or artesunate degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots either travelling alongside the solvent front or emerging near or even on the origin line.

XIII. RESULTS AND ACTIONS TO BE TAKEN

The artesunate spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA APÓS MARCAÇÃO COM ÁCIDO SULFÚRICO E CALOR

Frente do solvente

Mancha principal

Linha de base

1ª corrida: Concentração limite superior do artesunato, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior do artesunato, representando 80% do medicamento.

XII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO

Uma mancha castanha acinzentada com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,45 indica a presença de artesunato na solução de teste. Não devem existir mais manchas visíveis. Manchas nítidas adicionais formadas pela solução de teste indicam a presença de outros fármacos ou a degradação do artesunato, sendo este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, quer ao longo da frente do solvente, quer perto da linha ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de artesunato no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena, até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.8 Cephalexin

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 250, 500, 750 or 1000 mg of cephalexin.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release cephalexin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations of the main manual. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product does not pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Cephalexin is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Acetone
- 20) Ethyl acetate
- 21) Glacial acetic acid
- 22) Methanol
- 23) Water
- 24) Secondary reference standard, for example, cephalexin 250 mg tablets

6.8 Cefalexina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 250, 500, 750 ou 1000 mg de cefalexina.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de cefalexina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o medicamento não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A cefalexina é extraída de comprimidos e cápsulas com metanol e determinada por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetona
- 20) Acetato de etilo
- 21) Ácido acético glacial
- 22) Metanol
- 23) Água
- 24) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de cefalexina de 250 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, capsules containing 250 mg of cephalexin. Open one capsule by carefully separating the cap from the bottom shell and transfer all the powder into a 40-ml laboratory glass bottle adding the empty capsule shells last. For extraction, suspend the powder obtained in 25 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as 'Cephalexin Stock Standard Solution'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Cephalexin Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of cephalexin.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Cephalexin Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of cephalexin as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF CEPHALEXIN PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 40-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 25 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

500 MG OF CEPHALEXIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

750 MG OF CEPHALEXIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 75 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

1000 MG OF CEPHALEXIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 100 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Cephalexin Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo cápsulas de 250 mg de cefalexina. Abra uma cápsula, separando cuidadosamente as duas componentes e transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, acrescentando, por último, o invólucro. Para a extração, prepare uma suspensão com o pó obtido em 25 ml de metanol, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 10 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Cefalexina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,25 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Cefalexina a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior representa um medicamento de alta qualidade, que contém 100% de cefalexina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Cefalexina a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de cefalexina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 250 MG DE CEFALEXINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extração, adicione 25 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

500 MG DE CEFALEXINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 50 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

750 MG DE CEFALEXINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula, com 75 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

1000 MG DE CEFALEXINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 100 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 10 mg por ml de fármaco e serem rotuladas como "*Solução Stock de Amostra de Cefalexina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Cephalexin Stock Sample Solution*'.

The expected concentration of cephalexin in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of cephalexin of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 12.5 ml of ethyl acetate, 5 ml of acetone, 5 ml of glacial acetic acid and 2.5 ml of water into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 30 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de trabalho de Cefalexina*".

Estima-se que a concentração de cefalexina nesta solução de amostra seja de 1,25 mg por ml, devendo ser igual à concentração de cefalexina na solução padrão com concentração limite superior preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 12,5 ml de acetato de etilo, 5 ml de acetona, 5 ml de ácido acético glacial e 2,5 ml de água, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 30 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da identidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia, após a marcação com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Cephalixin's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Cephalixin's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue spot at a travel distance of about 0.36 indicates the presence of cephalixin in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or cephalixin degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all cephalixin spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The cephalixin spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior de trabalho da cefalexina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da cefalexina, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul nítida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,36 indica a presença de cefalexina na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação da cefalexina, sendo este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

Ao expor a placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de cefalexina anteriormente observadas a 254 nm tornam-se agora castanho-amareladas. Continue a observar a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de cefalexina no cromatograma obtido a partir da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena, até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.9 Chloramphenicol

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 250 or 500 mg of chloramphenicol.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release chloramphenicol tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Chloramphenicol is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) UV light of 254 nm
- 17) Ethyl acetate
- 18) Methanol
- 19) Toluene
- 20) Secondary reference standard, for example, chloramphenicol 250 mg tablets

6.9 Cloranfenicol

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula contém 250 ou 500 mg de cloranfenicol.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de cloranfenicol de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

O cloranfenicol é extraído de comprimidos e cápsulas com metanol e determinado por CCF, tendo em conta os padrões secundários de referência.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Luz ultravioleta de 254 nm
- 17) Acetato de etilo
- 18) Metanol
- 19) Tolueno
- 20) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de cloranfenicol de 250 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, capsules containing 250 mg of chloramphenicol. Open one capsule by carefully separating the cap from the bottom shell and transfer all the powder into a 40-ml laboratory glass bottle adding the empty capsule shells last. For extraction, suspend the powder obtained in 25 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Chloramphenicol Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Chloramphenicol Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of chloramphenicol.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2 mg of total drug per ml and be labelled as '*Chloramphenicol Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of chloramphenicol as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF CHLORAMPHENICOL PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 40-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a hard gelatine capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. Soft gelatin capsules are cut into pieces using a blade finally ensuring that both, content and shells, are completely transferred into the bottle. For extraction, add 25 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

500 MG OF CHLORAMPHENICOL PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Chloramphenicol Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo cápsulas de 250 mg de cloranfenicol. Abra uma cápsula, separando cuidadosamente as duas componentes e transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, acrescentando, por último, o invólucro. Para proceder à extracção, prepare uma suspensão com o pó obtido em 25 ml de metanol, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 10 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Cloranfenicol*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Cloranfenicol a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior de trabalho representa um medicamento de alta qualidade, que contém 100% de cloranfenicol.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Cloranfenicol a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior de trabalho representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de cloranfenicol, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DA AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 250 MG DE CLORANFENICOL POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml. O pó obtido de uma cápsula de gelatina dura deve ser directamente transferido para o frasco, adicionando, de seguida, o invólucro. As cápsulas de gelatina mole cortam-se em pedaços usando uma lâmina, assegurando-se que tanto o seu conteúdo como o invólucro são transferidos para o frasco na sua totalidade. Para proceder à extracção, adicione 25 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

500 MG DE CLORANFENICOL POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteiros e extraia o pó obtido com 50 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 10 mg por ml de fármaco e serem rotuladas como "*Solução Stock de Amostra de Cloranfenicol*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Chloramphenicol Stock Sample Solution*'.

The expected concentration of chloramphenicol in this working sample solution is 2.5 mg per ml and should match the concentration of chloramphenicol of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of ethyl acetate, 5 ml of toluene and 3 ml of methanol into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Cloranfenicol*".

Estima-se que a concentração de cloranfenicol nesta solução de amostra seja de 2,5 mg por ml, igualando a concentração de cloranfenicol na solução padrão, com concentração limite superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 15 ml de acetato de etilo, 5 ml de tolueno e 3 ml de metanol, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Chloramphenicol's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Chloramphenicol's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Satellite spot

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue spot at a travel distance of about 0.58 indicates the presence of chloramphenicol in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or chloramphenicol degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The chloramphenicol spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior do cloranfenicol, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior do cloranfenicol, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha secundária

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul nítida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,58 indica a presença de cloranfenicol na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indiciar a presença de outros fármacos ou a degradação do cloranfenicol, sendo este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de cloranfenicol no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.10 Chloroquine (as phosphate and sulphate)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 160 or 250 mg of chloroquine diphosphate equivalent to approximately a 100 and 150 mg of chloroquine free base, respectively. Other strengths are known to exist. Note that the chloroquine free base concentrations are the same in preparations containing 200 mg of chloroquine sulphate or 250 mg of chloroquine diphosphate.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release chloroquine tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Chloroquine phosphate and sulphate are extracted from tablets and capsules with water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1) Pestle

2) Aluminium foil

3) Funnel

4) Label tape

5) Marker pen

6) Pencil

7) 10-ml vials

8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)

9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)

10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm

11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)

12) TLC developing chamber (500-ml jar)

13) Hot plate

14) Filter paper

15) Pair of scissors

16) Pair of tweezers

17) UV light of 254 nm

18) Iodine chamber

19) Ethyl acetate

20) Methanol

21) Water

22) Ammonia solution 25%

23) Secondary reference standard, for example, chloroquine phosphate 250 mg tablets

6.10 Cloroquina (como fosfato e sulfato)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPEÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 160 ou 250 mg de difosfato de cloroquina, equivalente a aproximadamente 100 e 150 mg de cloroquina como base livre, respectivamente. Sabe-se que existem outras dosagens. Note que as concentrações de cloroquina na forma de base livre são as mesmas em preparações que contenham 200 mg de sulfato de cloroquina ou 250 mg de difosfato de cloroquina.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de cloroquina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

O fosfato e o sulfato de cloroquina são extraídos de comprimidos e cápsulas com água e determinados por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetato de etilo
- 20) Metanol
- 21) Água
- 22) Solução de amoníaco a 25%
- 23) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de fosfato de cloroquina de 250 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 250 mg of chloroquine phosphate. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 100-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 50 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of chloroquine phosphate or about 3 mg of chloroquine free base per ml and be labelled as '*Chloroquine Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 2 ml of water. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of chloroquine phosphate or about 1.5 mg of chloroquine free base per ml and be labelled as '*Chloroquine Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of chloroquine.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of water. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2 mg of chloroquine phosphate or about 1.25 mg of chloroquine free base per ml and be labelled as '*Chloroquine Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of chloroquine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 160 MG OF CHLOROQUINE PHOSPHATE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 40-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 32 ml of water using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

250 MG OF CHLOROQUINE PHOSPHAT PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of water using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

200 MG OF CHLOROQUINE PHOSPHATE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of water using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

The stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of chloroquine phosphate or 4 mg chloroquine sulphate; all of them being equivalent to about 3 mg of chloroquine free base per ml. Freshly prepare these solutions for each test and label them as '*Chloroquine Stock Sample Solution*'. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 250 mg de fosfato de cloroquina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar um pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 100 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 50 ml de água, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 5 mg de fosfato de cloroquina ou cerca de 3 mg de cloroquina como base livre por ml e ser rotulada como «*Solução Stock do Padrão de Cloroquina*». Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO_A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 2 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de água. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,5 mg de fosfato de cloroquina ou cerca de 1,5 mg de cloroquina como base livre por ml e ser rotulada como «*Solução Padrão de Trabalho de Cloroquina a 100%*».

Esta solução padrão com concentração limite superior de trabalho representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de cloroquina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 2 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de água. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2 mg de fosfato de cloroquina ou cerca de 1,25 mg de cloroquina como base livre por ml e ser rotulada como «*Solução Padrão de Trabalho de Cloroquina a 80%*».

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de cloroquina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DA AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 160 MG DE FOSFATO DE CLOROQUINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 32 ml de água, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

250 MG DE FOSFATO DE CLOROQUINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 50 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

200 MG DE FOSFATO DE CLOROQUINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 50 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

As soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 5 mg de fosfato de cloroquina ou 4 mg de sulfato de cloroquina, sendo todas elas equivalentes a cerca de 3 mg de cloroquina como base livre por ml. Prepare estas soluções de fresco para cada teste e rotule-as como «*Solução Stock de Amostra de Cloroquina*». Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 2 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 2 ml of water. Close and shake the vial and label as '*Chloroquine Working Sample Solution*'.

The expected concentration of chloroquine phosphate in the working sample solution is 2.5 mg and that of chloroquine sulphate 2 mg per ml; both being equivalent to about 1.5 mg of chloroquine free base per ml thus matching the chloroquine free base concentration of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 5 ml of ethyl acetate, 20 ml of methanol and 0.5 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 2 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de água. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Cloroquina*".

Estima-se que a concentração de fosfato de cloroquina nesta solução amostra de trabalho seja de 2,5 mg por ml e a de sulfato de cloroquina de 2 mg por ml. Devem equivaler a 1,5 mg de cloroquina como base livre por ml, igualando assim a concentração de cloroquina como base livre da solução padrão, de concentração limite superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares pode demorar algum tempo quando utilizar soluções aquosas de amostra. Para evitar que os resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 5 ml de acetato de etilo, 20 ml de metanol e 0,5 ml da solução concentrada de amoníaco, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da identidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia, após a marcação com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Chloroquine's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Chloroquine's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue spot at a travel distance of about 0.38 indicates the presence of chloroquine in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or chloroquine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all chloroquine spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The chloroquine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior da cloroquina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da cloroquina, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul nítida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,38 indica a presença de cloroquina na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação da cloroquina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

Ao expor a placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de cloroquina anteriormente observadas a 254 nm tornam-se agora castanho-amareladas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de cloroquina no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.11 Ciprofloxacin

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 100 to 750 mg of ciprofloxacin. Other strengths are known to exist.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release ciprofloxacin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Ciprofloxacin is extracted from tablets and capsules with water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) UV light of 254 nm
- 17) Acetone
- 18) Methanol
- 19) Toluene
- 20) Water
- 21) Ammonia solution 25%
- 22) Secondary reference standard, for example, ciprofloxacin 250 mg tablets

6.11 Ciprofloxacina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 100 a 750 mg de ciprofloxacina. Sabe-se que existem outras dosagens.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de ciprofloxacina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A ciprofloxacina é extraída de comprimidos e cápsulas com água e determinada por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Luz ultravioleta de 254 nm
- 17) Acetona
- 18) Metanol
- 19) Tolueno
- 20) Água
- 21) Solução de amoníaco a 25%
- 22) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de ciprofloxacina de 250 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 250 mg of ciprofloxacin. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 100-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 50 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ciprofloxacin Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.625 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ciprofloxacin Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of ciprofloxacin.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ciprofloxacin Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of ciprofloxacin as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF CIPROFLOXACIN PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 20 ml of water using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

250 MG OF CIPROFLOXACIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of water using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

500 MG OF CIPROFLOXACIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 100 ml of water using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

750 MG OF CIPROFLOXACIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 150 ml of water using a straight pipette and a 500-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ciprofloxacin Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 250 mg de ciprofloxacina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar na forma de um pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 100 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 50 ml de água, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como «*Solução Stock do Padrão de Ciprofloxacina*». Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 0,625 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Ciprofloxacina a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior de trabalho representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de ciprofloxacina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 0,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Ciprofloxacina a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de ciprofloxacina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DA AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 100 MG DE CIPROFLOXACINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de laboratório de vidro de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 20 ml de água, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

250 MG DE CIPROFLOXACINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 50 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

500 MG DE CIPROFLOXACINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula e extraia o pó obtido com 100 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

750 MG DE CIPROFLOXACINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteiros e extraia o pó obtido com 150 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 500 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 5 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Ciprofloxacina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Ciprofloxacin Working Sample Solution*'.

The expected concentration of ciprofloxacin in this working sample solution is 0.625 mg per ml and should match the concentration of ciprofloxacin of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 10 ml of methanol, 5 ml of acetone, 2.5 ml of toluene and 5 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Ciprofloxacina*".

Estima-se que a concentração de ciprofloxacina nesta solução de amostra seja de 0,625 mg por ml, devendo ser igual à concentração de ciprofloxacina na solução padrão, de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares pode demorar algum, tempo quando utilizar soluções aquosas de amostra. Para evitar que os resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 10 ml de metanol, 5 ml de acetona, 2,5 ml de tolueno e 5 ml da solução concentrada de amoníaco, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Ciprofloxacin's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Ciprofloxacin's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.55 indicates the presence of ciprofloxacin in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or ciprofloxacin degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The ciprofloxacin spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior da ciprofloxacina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da ciprofloxacina, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,55 indica a presença de ciprofloxacina na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indiciar a presença de outros fármacos ou a degradação da ciprofloxacina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de ciprofloxacina no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.8 Cloxacillin

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 250 or 500 mg of cloxacillin. Other strengths are known to exist.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release cloxacillin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product does not pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Cloxacillin is extracted from tablets and capsules with water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Ethyl acetate
- 20) Glacial acetic acid
- 21) Water
- 22) Secondary reference standard, for example, cloxacillin 250 mg tablets

6.8 Cloxacilina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula contém 250 ou 500 mg de cloxacilina. Sabe-se que existem outras dosagens.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de cloxacilina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A cloxacilina é extraída de comprimidos e cápsulas com água e determinada por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetato de etilo
- 20) Ácido acético glacial
- 21) Água
- 22) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de cloxacilina de 250 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 250 mg of cloxacillin. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 100-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 40 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 6.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Cloxacillin Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

The cloxacillin stock standard solution requires no further dilution. It already represents the final working concentration of 6.25 mg of total drug per ml. Just for more convenient handling, some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of cloxacillin.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 1 ml of water. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Cloxacillin Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of cloxacillin as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF CLOXACILLIN PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 100-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 40 ml of water using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

500 MG OF CLOXACILLIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 80 ml of water using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 6.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Cloxacillin Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 250 mg de cloxacilina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 100 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 40 ml de água, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 6,25 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Cloxacilina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

A solução padrão de cloxacilina não requer diluição adicional. Já contém a concentração final de trabalho de 6,25 mg de fármaco por ml. Para facilitar o manuseamento, pode transferir algum líquido sobrenadante para um frasco de 10 ml.

Esta solução padrão, com concentração limite superior de trabalho, representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de cloxacilina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 1 ml de água. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Cloxacilina a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de cloxacilina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DA AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 250 MG DE CLOXACILINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de laboratório de vidro de 100 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 40 ml de água, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

500 MG DE CLOXACILINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteiros e extraia o pó obtido com 80 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 6,25 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Cloxacilina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Cloxacillin stock sample solutions require no further dilution. They already represent the final working concentration of 6.25 mg of total drug per ml. If prepared from a high quality product, this sample solution should match the concentration of cloxacillin of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 μ l of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of ethyl acetate, 5 ml of glacial acetic acid and 5 ml of water into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 30 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and expose the chromatoplate to iodine vapour for about one minute. Remove the plate from the iodine chamber and observe the plate at daylight. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

As soluções stock da amostra de cloxacilina não requerem diluição adicional. Já contêm a concentração final de trabalho de 6,25 mg de fármaco por ml. Se preparada a partir de um produto de alta qualidade, a solução de amostra deve ser igual à concentração de cloxacilina na solução padrão, de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares pode demorar algum tempo quando utilizar soluções aquosas de amostra. Para evitar que os resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 15 ml de acetato de etilo, 5 ml de ácido acético glacial e 5 ml de água, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 30 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem e exponha a placa cromatográfica ao vapor de iodo durante cerca de um minuto. Remova a placa da câmara de iodo e observe-a à luz do dia. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

Run No.1: Cloxacillin's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Cloxacillin's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

Satellite spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

A strong brown spot at a travel distance of about 0.83 indicates the presence of cloxacillin in the test solution. The principal spot might come together with a smaller satellite spot having a relative retention factor of about 0.35. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The cloxacillin spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

1ª corrida: Concentração limite superior da cloxacilina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da cloxacilina, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

Mancha secundária

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

Uma mancha castanha nítida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,83 indica a presença de cloxacilina na solução de teste. Esta mancha principal pode vir acompanhada de uma mancha secundária mais pequena com um factor de retenção relativa de cerca de 0,35. Manchas nítidas adicionais formadas pela solução de teste poderiam indicar a presença de outros fármacos. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de cloxacilina no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.13 Didanosine

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Didanosine is usually presented as a buffered chewable or dispersible tablet in strengths of 25 to 400 mg of total drug. Buffered powder for oral solutions is supplied in single-dose sachets containing 100 to 250 mg of didanosine. Unbuffered enteric-coated capsules are coming in strengths of a 125, 200, 250 and 400 mg of didanosine. For paediatric use, didanosine may be presented as powder for reconstitution in bottles containing 2000 or 4000 mg of total drug.

II. DISINTEGRATION TEST

In order to verify label claims on enteric-coating subject appropriate tablets and capsules to a disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should not pass this test. Enteric-coated tablets, capsules or granules passing this test might have defective coatings and their drug content will degrade during the passage of the gastro-intestinal tract. In this case, they will be useless even when containing an appropriate drug level. However, all quick release didanosine formulations have to pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Didanosine is extracted from powder obtained from tablets, capsules, sachets or bottles with water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1) Pestle

2) Aluminium foil

3) Funnel

4) Label tape

5) Marker pen

6) Pencil

7) 10-ml vials

8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)

9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)

10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm

11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)

12) TLC developing chamber (500-ml jar)

13) Hot plate

14) Filter paper

15) Pair of scissors

16) Pair of tweezers

17) UV light of 254 nm

18) Iodine chamber

19) Ethyl acetate

20) Methanol

21) Toluene

22) Water

23) Ammonia solution 25 %

24) Secondary reference standard, for example, didanosine 125 or 200 mg tablets

6.13 Didanosina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. A didanosina apresenta-se normalmente sob a forma de comprimidos tamponados mastigáveis ou dispersíveis em dosagens de 25 a 400 mg. O pó tamponado para soluções orais apresenta-se em doses unitárias embaladas em saquetas, contendo 100 a 250 mg de didanosina. As cápsulas de revestimento entérico não tamponadas apresentam-se em dosagens de 125, 200, 250 e 400 mg de didanosina. Para uso pediátrico a didanosina pode apresentar-se em pó para reconstituição em frascos, contendo 2000 ou 4000 mg desta substância.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Para verificar a veracidade da informação constante do rótulo relativamente ao revestimento entérico, os comprimidos e cápsulas devem ser sujeitos a um teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Não devem passar neste teste. Os comprimidos, cápsulas ou grânulos com revestimento entérico que se dissolverem em menos de trinta minutos podem ter revestimentos defeituosos, o que causará a deterioração do fármaco que contém, durante a sua passagem pelo tracto gastrointestinal. Neste caso, serão inúteis, mesmo que contenham a quantidade correcta do fármaco. Por outro lado, todas as formulações de didanosina de libertação rápida devem passar neste teste.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A didanosina é extraída do pó obtido a partir de comprimidos, cápsulas, saquetas ou frascos, com água e determinada por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetato de etilo
- 20) Metanol
- 21) Tolueno
- 22) Água
- 23) Solução de amoníaco a 25 %
- 24) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de didanosina de 125 ou 200 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, capsules containing 125 or 200 mg of didanosine. Open one capsule by carefully separating the cap from the bottom shell and transfer all the powder into a 40-ml laboratory glass bottle adding the empty capsule shells last. For the extraction of 125-mg-capsules, suspend the powder obtained in 25 ml and for the extraction of 200-mg-capsules in 40 ml of water using appropriate straight pipettes. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. For perfect extraction, allow the solution to sit for an additional 25 minutes. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Didanosine Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Didanosine Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of didanosine.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Didanosine Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of didanosine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 25 MG OF DIDANOSINE PER UNIT

Take two (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into an appropriate laboratory glass bottle. Powder obtained from capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of water using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. For perfect extraction, allow the solution to sit for an additional 25 minutes.

50 MG OF DIDANOSINE PER UNIT

Take one sample tablet, capsule or sachet and extract the powder obtained with 10 ml of water following the procedure shown above.

100 MG OF DIDANOSINE PER UNIT

Take one sample tablet, capsule or sachet and extract the powder obtained with 20 ml of water following the procedure shown above.

125 MG OF DIDANOSINE PER UNIT

Take one sample tablet, capsule or sachet and extract the powder obtained with 25 ml of water following the procedure shown above.

150 MG OF DIDANOSINE PER UNIT

Take one sample tablet, capsule or sachet and extract the powder obtained with 30 ml of water following the procedure shown above.

200 MG OF DIDANOSINE PER UNIT

Take one sample tablet, capsule or sachet and extract the powder obtained with 40 ml of water following the procedure shown above.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo cápsulas de 125 ou 200 mg de didanosina. Abra uma cápsula, separando cuidadosamente as duas componentes e transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, acrescentando, por último, o invólucro. Para proceder à extracção de cápsulas de 125 mg, prepare uma suspensão do pó obtido em 25 ml de água. Para a extracção das cápsulas de 200 mg é prepare a suspensão com 40 ml de água, usando pipetas graduadas apropriadas. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Para que a extracção seja perfeita deixe a solução repousar por mais 25 minutos. A solução obtida deve conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como «*Solução Stock do Padrão de Didanosina*». Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,25 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Didanosina a 100%*".

Esta solução padrão, com concentração limite superior de trabalho, representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de didanosina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Didanosina a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de didanosina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DA AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 25 MG DE DIDANOSINA POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório apropriado. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido das cápsulas, adicionando, de seguida, o revestimento. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de água, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Para que a extracção seja perfeita deixe a solução repousar por mais 25 minutos.

50 MG DE DIDANOSINA POR UNIDADE

Retire um comprimido, cápsula ou saqueta e extraia o pó obtido com 10 ml de água, conforme o procedimento anterior.

100 MG DE DIDANOSINA POR UNIDADE

Retire um comprimido, cápsula ou saqueta e extraia o pó obtido com 20 ml de água, conforme o procedimento anterior.

125 MG DE DIDANOSINA POR UNIDADE

Retire um comprimido, cápsula ou saqueta e extraia o pó obtido com 25 ml de água, conforme o procedimento anterior.

150 MG DE DIDANOSINA POR UNIDADE

Retire um comprimido, cápsula ou saqueta e extraia o pó obtido com 30 ml de água, conforme o procedimento anterior.

200 MG DE DIDANOSINA POR UNIDADE

Retire um comprimido, cápsula ou saqueta e extraia o pó obtido com 40 ml de água, conforme o procedimento anterior.

250 MG OF DIDANOSINE PER UNIT

Take one sample tablet, capsule or sachet and extract the powder obtained with 50 ml of water following the procedure shown above.

400 MG OF DIDANOSINE PER UNIT

Take one sample tablet, capsule or sachet and extract the powder obtained with 80 ml of water following the procedure shown above.

2000 MG OF DIDANOSINE PER UNIT

Take one sample container and prepare the paediatric solution with a 100 ml of water according to the manufacturer's directions in order to obtain a concentration of 20 mg of didanosine per ml. Transfer 5 ml of this solution into a 25-ml laboratory glass bottle and mix with 15 ml of water using appropriate straight pipettes.

4000 MG OF DIDANOSINE PER UNIT

Take one sample container and prepare the paediatric solution with 200 ml of water according to the manufacturer's directions in order to obtain a concentration of 20 mg of didanosine per ml. Transfer 5 ml of this solution into a 25-ml laboratory glass bottle and mix with 15 ml of water using appropriate straight pipettes.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Didanosine Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Didanosine Working Sample Solution*'.

The expected concentration of didanosine in this working sample solution is 1.25 mg of total drug per ml and should match the concentration of didanosine of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 13 ml of methanol, 4 ml of toluene, 3 ml of ethyl acetate and 0.2 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

250 MG DE DIDANOSINA POR UNIDADE

Retire um comprimido, cápsula ou saqueta e extraia o pó obtido com 50 ml de água, conforme o procedimento anterior.

400 MG DE DIDANOSINA POR UNIDADE

Retire um comprimido, cápsula ou saqueta e extraia o pó obtido com 80 ml de água, conforme o procedimento anterior.

2000 MG DE DIDANOSINA POR UNIDADE

Prepare a solução pediátrica num recipiente para amostras com 100 ml de água, de acordo com as instruções do laboratório fabricante, de modo a obter uma concentração de 20 mg de didanosina por ml. Transfira 5 ml desta solução para um frasco de laboratório de vidro de 25 ml e misture com 15 ml de água, usando pipetas graduadas adequadas.

4000 MG DE DIDANOSINA POR UNIDADE

Prepare a solução pediátrica num recipiente para amostras com 200 ml de água, de acordo com as instruções do laboratório fabricante, de modo a obter uma concentração de 20 mg de didanosina por ml. Transfira 5 ml desta solução para um frasco de laboratório de vidro de 25 ml e misture com 15 ml de água, usando pipetas graduadas adequadas.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 5 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock da Amostra de Didanosina*". Prepare estas soluções de fresco para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Didanosina*".

Estima-se que a concentração de didanosina nesta solução de amostra seja de 1,25 mg de fármaco por ml, igualando a concentração de didanosina na solução padrão de trabalho, de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares pode demorar algum tempo quando utilizar soluções aquosas de amostra. Para evitar que os resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 13 ml de metanol, 4 ml de tolueno, 3 ml de acetato de etilo e 0,2 ml da solução concentrada de amoníaco, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Didanosine's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Didanosine's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue spot at a travel distance of about 0.40 indicates the presence of didanosine in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or didanosine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all didanosine spots already observed at 254 nm are now turning orange-brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The didanosine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da identidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia, após a marcação com iodo.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior da didanosina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da didanosina, apresentando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul nítida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,40 indica a presença de didanosina na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação da didanosina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

Ao expor a placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de didanosina anteriormente observadas a 254 nm tornam-se castanho-alaranjadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de didanosina no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.14 Erythromycin (as free base and stearate)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains erythromycin stearate equivalent to 250 or 500 mg of erythromycin free base. Depending on the geographical region, dosage strengths of a 180 and 360 mg free base can be observed. Other strengths and salt forms are known to exist. Tablets and capsules containing erythromycin as free base may be enteric-coated or contain enteric-coated granules.

II. DISINTEGRATION TEST

In order to verify label claims on enteric-coating subject appropriate erythromycin tablets and capsules to a disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should not pass this test. Enteric-coated tablets, capsules or granules passing this test might have defective coatings and their drug content will degrade during the passage of the gastrointestinal tract. In this case, they will be useless even when containing an appropriate drug level. However, all quick release erythromycin formulations have to pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Erythromycin stearate and its free base equivalent are extracted from powder obtained from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Ethyl acetate
- 20) Methanol
- 21) Ammonia solution 25 %
- 22) Secondary reference standard, for example, erythromycin 250 mg tablets

6.14 Eritromicina (como base livre e estearato)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula contém estearato de eritromicina equivalente a 250 ou 500 mg de eritromicina na forma de base livre. Dependendo da região geográfica, encontramos bases livres doseadas a 180 e 360 mg. Sabe-se que existem outras dosagens e formas de sais. Os comprimidos e cápsulas que contenham eritromicina como base livre podem ter revestimento entérico ou conter grânulos com revestimento entérico.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Para verificar a veracidade da informação constante do rótulo, os comprimidos e cápsulas de revestimento entérico de eritromicina devem ser sujeitos ao teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Não devem passar neste teste. Os comprimidos, cápsulas ou grânulos com revestimento entérico que se dissolverem em menos de trinta minutos podem ter revestimentos defeituosos, o que causará a deterioração do fármaco que contém, durante a sua passagem pelo tracto gastrointestinal. Neste caso, serão inúteis, mesmo que contenham a quantidade correcta do fármaco. Por outro lado, todas as formulações de eritromicina de libertação rápida devem passar neste teste.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A eritromicina na forma de estearato e na forma de base livre são extraídas do pó obtido de comprimidos e cápsulas com metanol e determinada por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetato de etilo
- 20) Metanol
- 21) Solução de amoníaco a 25%
- 22) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de eritromicina de 250 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 250 mg of erythromycin. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 10 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 25 mg of total drug per ml and be labelled as 'Erythromycin Stock Standard Solution'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 2 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 12.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Erythromycin Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of erythromycin.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Erythromycin Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of erythromycin as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF ERYTHROMYCIN PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

360 MG OF ERYTHROMYCIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 14.4 ml of methanol using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

500 MG OF ERYTHROMYCIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 20 ml of methanol using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Erythromycin Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 250 mg de eritromicina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Despeje, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 10 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 25 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Eritromicina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 2 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 12,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Eritromicina a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior de trabalho representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de eritromicina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 2 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 10 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Eritromicina a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de eritromicina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 250 MG DE ERITROMICINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de laboratório de vidro de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

360 MG DE ERITROMICINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 14,4 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

500 MG DE ERITROMICINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 20 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 25 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock de Amostra de Eritromicina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 2 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 2 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Erythromycin Working Sample Solution*'.

The expected concentration of erythromycin in this working sample solution is 1.25 mg of total drug per ml and should match the concentration of erythromycin of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 20 ml of methanol, 5 ml of ethyl acetate and 0.5 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and expose the chromatoplate to iodine vapour for about one minute. Remove the plate from the iodine chamber and observe the plate at daylight. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 2 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Eritromicina*”.

Estima-se que a concentração de eritromicina nesta solução de amostra seja de 1,25 mg de fármaco por ml, igualando a concentração de eritromicina na solução padrão de trabalho, de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e aplique 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. REVELAÇÃO

Transfira 20 ml de metanol, 5 ml de acetato de etilo e 0,5 ml da solução concentrada de amoníaco, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. DETECÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem e exponha a placa cromatográfica ao vapor de iodo durante cerca de um minuto. Remova a placa da câmara de iodo e observe-a à luz do dia. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

Run No.1: Erythromycin's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Erythromycin's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Stearic acid

Principal spot for Erythromycin

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

A strong orange-brown spot at a travel distance of about 0.60 indicates the presence of erythromycin in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at different erythromycin salt forms, other drugs or erythromycin degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots either travelling alongside the solvent front or emerging near or even on the origin line. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The erythromycin spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

1ª corrida: Concentração limite superior da eritromicina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da eritromicina, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Ácido esteárico

Mancha principal de Eritromicina

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

Uma mancha castanho-alaranjada nítida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,60 indica a presença de eritromicina na solução de teste. Manchas nítidas adicionais formadas pela solução de teste poderiam indicar a presença de outros sais de eritromicina, outros medicamentos ou a degradação da eritromicina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas quer ao longo da frente do solvente quer perto da linha ou sobre esta. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de eritromicina no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.14 Ethambutol (including fixed-dose combinations)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 100 to 400 mg of ethambutol hydrochloride. Higher strengths, for example 800 mg of ethambutol hydrochloride are known to exist.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release ethambutol tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product does not pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Ethambutol hydrochloride is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with other antituberculosis drugs, all compounds can be extracted and analysed simultaneously.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) TLC dipping chamber (200-ml beaker)
- 19) Ninhydrin
- 20) Glacial acetic acid
- 21) Methanol
- 22) Toluene
- 23) Ammonia solution 25 %
- 24) Secondary reference standard, for example, ethambutol hydrochloride 400 mg tablets

6.14 Etambutol (incluindo produtos com combinações de doses fixas)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 100 a 400 mg de cloridrato de etambutol. Sabe-se que existem dosagens superiores, por exemplo 800 mg de cloridrato de etambutol.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de etambutol de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

O cloridrato de etambutol é extraído de comprimidos e cápsulas com metanol e determinado por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico. Quando é combinado com outros agentes antituberculosos, todos os compostos podem ser simultaneamente extraídos e anagraduados.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de imersão da placa cromatográfica (proveta de 200 ml)
- 19) Ninidrina.
- 20) Ácido acético glacial
- 21) Metanol
- 22) Tolueno
- 23) Solução de amoníaco a 25%
- 24) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de cloridrato de etambutol de 400 mg.

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 400 mg of ethambutol hydrochloride. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 100-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 40 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ethambutol Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ethambutol Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of ethambutol hydrochloride.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ethambutol Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of ethambutol hydrochloride as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF ETHAMBUTOL HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

300 MG OF ETHAMBUTOL HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 30ml of methanol using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

400 MG OF ETHAMBUTOL HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 40 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 400 mg de cloridrato de etambutol. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Despeje, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 100 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 40 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 10 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Etambutol*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,25 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Etambutol a 100%*".

Esta solução padrão, com concentração limite superior de trabalho, representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de cloridrato de etambutol.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Etambutol a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de cloridrato de etambutol, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 100 MG DE CLORIDRATO DE ETAMBUTOL POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de laboratório de vidro de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

300 MG DE CLORIDRATO DE ETAMBUTOL POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 30 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

400 MG DE CLORIDRATO DE ETAMBUTOL POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 40 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

800 MG OF ETHAMBUTOL HYDROCHLORIDE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 80 ml of methanol using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Ethambutol Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Ethambutol Working Sample Solution*'. The expected concentration of ethambutol hydrochloride in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of ethambutol of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 12 ml of methanol, 10 ml of toluene and 0.5 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection first in case ethambutol is combined with other antituberculosis medicines.

For ethambutol detection, expose the TLC plate to the ninhydrin staining solution as shown on page 26. For this, dissolve 3 g of ninhydrin (about 10 times a well filled spatula) in a mixture of a 150 ml of methanol and 30 ml of glacial acetic acid. Use the plastic beaker supplied to accommodate the staining solution. This will allow dipping the chromatoplate into the solution using a pair of tweezers. Instantly remove the plate from the beaker and dry the back of the plate with paper tissue. Continue to dry off all staining solution on a hot plate and observe how the ethambutol spots are gradually becoming visible. Use this method of detection for quantification purposes. Ninhydrin staining will make it impossible to further observe spots made of isoniazid or pyrazinamide under UV light of 254 nm.

Note that all skin contaminated with ninhydrin solution will be stained as well. However, this is not dangerous to health and the blue-violet spots will disappear after about two days.

800 MG DE CLORIDRATO DE ETAMBUTOL POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 80 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 10 mg por ml de fármaco e serem rotuladas como “*Solução Stock Amostra de Etambutol*”. Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Etambutol*”.

Estima-se que a concentração de cloridrato de etambutol nesta solução de amostra de trabalho seja de 1,25 mg por ml, igualando a concentração de etambutol na solução padrão de trabalho, de eficácia superior, preparada anteriormente.

Estima-se que a concentração de eritromicina nesta solução de amostra seja de 1,25 mg de fármaco por ml, igualando a concentração de eritromicina na solução padrão de trabalho, de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 12 ml de metanol, 10 ml de tolueno e 0,5 ml da solução concentrada de amoníaco, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use primeiro este método de revelação no caso da associação do etambutol com outros medicamentos antituberculosos.

Para detectar o etambutol, exponha a placa de CCF à solução de ninidrina., como se mostra na página 26. Para isso, dissolva 3 g of ninidrina. (cerca de 10 vezes uma espátula bem cheia) numa mistura de 150 ml de metanol e 30 ml de ácido acético glacial. Use a proveta de plástico fornecida, para preparar e armazenar a solução corante. Isto permitirá mergulhar a placa cromatográfica na solução, usando uma pinça. Remova imediatamente a placa do medidor e seque a parte de trás da placa com um papel absorvente. Faça com que toda a solução corante se evapore, usando uma placa de aquecimento e observe a forma como as manchas de etambutol se tornam gradualmente visíveis. Use este método de revelação para efeitos de quantificação. Tenha em conta que a coloração com ninidrina. tornará impossível a observação posterior de manchas de isoniazida ou pirazinamida sob luz ultravioleta de 254 nm.

Note-se que a pele contaminada com ninidrina também ficará manchada. Todavia, isso não constitui perigo para a saúde, e as manchas azul-violeta desaparecerão após cerca de dois dias.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED AFTER STAINING WITH NINHYDRIN

Run No.1: Ethambutol's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Ethambutol's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Rifampicin's principal spot

Ethambutol's principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

Ethambutol stays invisible and no other spots should be detected unless the medicine under investigation is presented as a fixed-dose combination product containing also other antituberculosis compounds. In the latter case, spots made of isoniazid will become visible at a travel distance of about 0.45 and spots made of pyrazinamide at a travel distance of about 0.56. Spots made of rifampicin will be visible at a travel distance of about 0.71 at daylight already. For all of this, consult the picture shown on page 163.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER NINHYDRIN STAINING

A red spot at a travel distance of about 0.33 indicates the presence of ethambutol in the test solution. Apart from rifampicin, no other spots should become visible, even if ethambutol is combined with isoniazid and pyrazinamide. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or ethambutol degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The ethambutol spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA APÓS COLORAÇÃO COM NINIDRINA.

1ª corrida: Concentração limite superior do etambutol, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior do etambutol, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal de rifampicina

Mancha principal de etambutol

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

O etambutol permanece invisível e não deve haver outras manchas, a não ser que o medicamento em análise se apresente como um produto de combinação de dose fixa, contendo também outras substâncias antituberculosas. Neste último caso, as manchas de isoniazida tornar-se-ão visíveis a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,45 e as manchas de pirazinamida a uma distância de cerca de 0,56. As manchas de rifampicina ficarão visíveis a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,71 mesmo só com a luz do dia. Para tudo isto consulte a figura da página 163.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS COLORAÇÃO COM NINIDRINA.

Uma mancha vermelha com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,33 indica a presença de etambutol na solução de teste. Não deve haver mais manchas visíveis, além das de rifampicina, mesmo se o etambutol estiver combinado com isoniazida e pirazinamida. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indiciar a presença de outros fármacos ou a degradação do etambutol, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de etambutol no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.16 Furosemide

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 40 mg of furosemide. For specific disease patterns, much higher strengths are known to exist.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release furosemide tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It is a major defect if a drug product does not pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Furosemide is extracted from tablets and capsules with acetone and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Acetone
- 20) Methanol
- 21) Toluene
- 22) Secondary reference standard, for example, furosemide 40 mg tablets

6.16 Furosemida

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. Inspeção Visual

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 40 mg de furosemida. Sabe-se que existem outras dosagens mais fortes, para padrões de doença específicos.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de furosemida de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A furosemida é extraída de comprimidos e cápsulas com acetona e determinada por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetona
- 20) Metanol
- 21) Tolueno
- 22) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de furosemida de 40 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 40 mg of furosemide. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 20 ml of acetone using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 2 mg of total drug per ml and be labelled as '*Furosemide Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

The furosemide stock standard solution requires no further dilution. It already represents the final working concentration of 2 mg of total drug per ml. Just for more convenient handling, some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of furosemide.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 4 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 1 ml of acetone. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.6 mg of total drug per ml and be labelled as '*Furosemide Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of furosemide as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 40 MG OF FUROSEMIDE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 20 ml of acetone using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution produced should contain 2 mg of total drug per ml and be labelled as '*Furosemide Stock Sample Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 40 mg de furosemida. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Despeje, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 20 ml de acetona com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 2 mg de fármaco por ml e ser rotulada como «*Solução Stock do Padrão de Furosemida*». Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

A solução padrão de furosemida não requer diluição adicional. Já contem a concentração final de trabalho de 2 mg de fármaco por ml. Para facilitar o manuseamento, pode transferir algum líquido sobrenadante para um frasco de 10 ml.

Esta solução padrão de trabalho, com concentração limite superior, representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de furosemida.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 4 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 1 ml de acetona. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,6 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Furosemida a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de furosemida, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 40 MG DE FUROSEMIDA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de laboratório de vidro de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 20 ml de acetona, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 2 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Furosemida*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Furosemide stock sample solutions require no further dilution. They already represent the final working concentration of 2 mg of total drug per ml. If prepared from a high quality product, the sample solution should match the concentration of furosemide of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 21 ml of methanol, 2 ml of acetone and 2 ml of toluene into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

As soluções amostra de furosemida não requerem diluição adicional. Já contêm a concentração final de eficácia de 2 mg de fármaco por ml. Se preparada a partir de um produto de alta qualidade, a solução de amostra deve ser igual à concentração de furosemida na solução padrão de eficácia superior preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 21 ml de metanol, 2 ml de acetona e 2 ml de tolueno, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da identidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia, após a marcação com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Furosemide's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Furosemide's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.78 indicates the presence of furosemide in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or furosemide degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all furosemide spots already observed at 254 nm are now turning yellowish brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The furosemide spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior da furosemida, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da furosemida, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,78 indica a presença de furosemida na solução de teste. Manchas nítidas adicionais formadas pela solução de teste poderiam indicar a presença de outros fármacos ou a degradação da furosemida, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

Ao expor a placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de furosemida anteriormente observadas a 254 nm tornam-se agora castanho-amareladas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de furosemida no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.17 Glibenclamide

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Depending on the geographical region, each tablet or capsule will contain 1.75, 2.5, 3.5 or 5.0 mg of glibenclamide.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release glibenclamide tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37°C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product does not pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Glibenclamide is extracted from tablets and capsules with methanolic ethyl acetate solution and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) UV light of 254 nm
- 17) Ethyl acetate
- 18) Methanol
- 19) Toluene
- 20) Ammonia solution 25 %
- 21) Secondary reference standard, for example, glibenclamide 5 mg tablets

6.17 Glibenclamida

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Dependendo da região geográfica, cada comprimido ou cápsula contém 1,75 mg, 2,5 mg, 3,5 mg ou 5,0 mg de glibenclamida.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de glibenclamida de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A glibenclamida é extraída de comprimidos e cápsulas com solução metanólica de acetato de etilo e determinada por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Luz ultravioleta de 254 nm
- 17) Acetato de etilo
- 18) Metanol
- 19) Tolueno
- 20) Solução de amoníaco a 25%
- 21) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de 5 mg de glibenclamida.

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 5 mg of glibenclamide. Wrap up two (!) reference tablets into aluminium foil and crush them down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 5 ml of methanol followed by 5 ml of ethyl acetate using each time appropriate straight pipettes. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 1 mg of total drug per ml and be labelled as '*Glibenclamide Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

The glibenclamide stock standard solution requires no further dilution. It already represents the final working concentration of 1 mg of total drug per ml. Just for more convenient handling, some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of glibenclamide.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 4 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 1 ml of ethyl acetate. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.8 mg of total drug per ml and be labelled as '*Glibenclamide Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of glibenclamide as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 1.75 MG OF GLIBENCLAMIDE PER UNIT

Take six (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 5 ml of methanol followed by 5.5 ml ethyl acetate using appropriate straight pipettes, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

2.5 MG OF GLIBENCLAMIDE PER UNIT

Take four (!) whole sample tablets or capsules and extract the powder obtained with 5 ml of methanol followed by 5 ml of ethyl acetate using appropriate straight pipettes and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 5 mg de glibenclamida. Embrulhe dois (!) comprimidos de referência em folha de alumínio e esmague-os, até ficarem em pó, usando o pilão. Despeje, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos, primeiro com 5 ml de metanol e seguidamente com 5 ml de acetato de etilo. Utilize pipetas graduadas nos dois procedimentos. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 1 mg de fármaco por ml e ser rotulada como «*Solução Stock do Padrão de Glibenclamida*». Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

A solução padrão de glibenclamida não requer diluição adicional. Já contem a concentração final de eficácia de 1 mg de fármaco puro por ml. Para facilitar o manuseamento, pode transferir algum líquido sobrenadante para um frasco de 10 ml.

Esta solução padrão com concentração limite superior de trabalho representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de glibenclamida.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 4 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 1 ml de acetato de etilo. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 0,8 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Glibenclamida a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de glibenclamida, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 1,75 MG DE GLIBENCLAMIDA POR UNIDADE

Retire seis (!) comprimidos ou cápsulas inteiras de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de laboratório de vidro de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido das cápsulas de amostra, adicionando, por último, os revestimentos. Para proceder à extracção, adicione 5 ml de metanol, seguidos de 5,5 ml de acetato de etilo, usando pipetas graduadas. Feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

2,5 MG DE GLIBENCLAMIDA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de quatro (!) comprimidos ou cápsulas com 5 ml de metanol, seguidos de 5 ml de acetato de etilo, usando pipetas graduadas apropriadas e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como cr para amostras. Continue como indicado anteriormente.

3.5 MG OF GLIBENCLAMIDE PER UNIT

Take three (!) whole sample tablets or capsules and extract the powder obtained with 5 ml of methanol followed by 5.5 ml of ethyl acetate using appropriate straight pipettes and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

5 MG OF GLIBENCLAMIDE PER UNIT

Take two (!) whole sample tablets or capsules and extract the powder obtained with 5 ml of methanol followed by 5 ml of ethyl acetate using appropriate straight pipettes and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 1 mg of total drug per ml and be labelled as '*Glibenclamide Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Glibenclamide stock sample solutions require no further dilution. They already represent the final working concentration of 1 mg of total drug per ml. If prepared from a high quality product, the sample solution should match the concentration of glibenclamide of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 11 ml of ethyl acetate, 7 ml of methanol, 1 ml of toluene and 1 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

3,5 MG DE GLIBENCLAMIDA POR UNIDADE

Retire da amostra três (!) comprimidos ou cápsulas inteiros e extraia o pó com 5 ml de metanol, seguidos de 5,5 ml de acetato de etilo, usando pipetas graduadas apropriadas e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

5 MG DE GLIBENCLAMIDA POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas e extraia o pó obtido com 5 ml de metanol e, seguidamente, com 5 ml de acetato de etilo. Utilize, em ambos os procedimentos, pipetas graduadas e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 1 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como “*Solução Stock de Amostra de Glibenclamida*”. Prepare estas soluções de fresco para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

As soluções amostra de glibenclamida não requerem diluição adicional. Já contêm a concentração final de eficácia de 1 mg de fármaco por ml. Se for preparada a partir de um produto de alta qualidade, a solução de amostra deve igualar a concentração de glibenclamida na solução padrão, de concentração limite superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 11 ml de acetato de etilo, 7 ml de metanol, 1 ml de tolueno e 1 ml de solução concentrada de amoníaco, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Glibenclamide's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Glibenclamide's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.65 indicates the presence of glibenclamide in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or glibenclamide degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The glibenclamide spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior da glibenclamida, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da glibenclamida, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,65 indica a presença de glibenclamida na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indiciar a presença de outros fármacos ou a degradação da glibenclamida, sendo este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de glibenclamida no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.18 Griseofulvin

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 125, 250 or 500 mg of griseofulvin.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release griseofulvin tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Griseofulvin is extracted from tablets and capsules with acetone and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) UV light of 254 nm
- 17) Acetone
- 18) Ethyl acetate
- 19) Methanol
- 20) Secondary reference standard, for example, griseofulvin 125 mg tablets

6.18 Griseofulvina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 125, 250 ou 500 mg de griseofulvina.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de griseofulvina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A griseofulvina é extraída de comprimidos e cápsulas através de acetona e determinada por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Luz ultravioleta de 254 nm
- 17) Acetona
- 18) Acetato de etilo
- 19) Metanol
- 20) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de 125 mg de griseofulvina.

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 125 mg of griseofulvin. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 12.5 ml of acetone using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Griseofulvin Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 7 ml of acetone. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Griseofulvin Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of griseofulvin.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 9 ml of acetone. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Griseofulvin Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of griseofulvin as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 125 MG OF GRISEOFULVIN PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-mL laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 12.5 ml of acetone using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

250 MG OF GRISEOFULVIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 25 ml of acetone using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

500 MG OF GRISEOFULVIN PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 50 ml of acetone using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Griseofulvin Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 125 mg de griseofulvina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Despeje, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 12,5 ml de acetona com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 10 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Griseofulvina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO_A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de acetona. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,25 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Griseofulvina a 100%*".

Esta solução padrão, com concentração limite superior de trabalho, representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de griseofulvina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 9 ml de acetona. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Griseofulvina a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de griseofulvina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 125 MG DE GRISEOFULVINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 12,5 ml de acetona, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

250 MG DE GRISEOFULVINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 25 ml de acetona, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

500 MG DE GRISEOFULVINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 50 ml de acetona, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 10 mg por ml de fármaco e serem rotuladas como "*Solução Stock de Amostra de Griseofulvina*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 7 ml of acetone. Close and shake the vial and label as '*Griseofulvin Stock Sample Solution*'.

The expected concentration of griseofulvin in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of griseofulvin of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 18 ml of ethyl acetate and 4 ml of methanol into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 7 ml de acetona. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Griseofulvina*".

Estima-se que a concentração de griseofulvina nesta solução de amostra seja de 1,25 mg por ml, devendo igualar a concentração de griseofulvina na solução padrão de concentração limite superior preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 18 ml de acetato de etilo e 4 ml de metanol, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Griseofulvin's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Griseofulvin's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue spot at a travel distance of about 0.62 indicates the presence of griseofulvin in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or griseofulvin degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The griseofulvin spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. Placa Cromatográfica Observada sob Luz Ultravioleta de 254 nm

1ª corrida: Concentração limite superior da griseofulvina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da griseofulvina, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul nítida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,62 indica a presença de griseofulvina na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indiciar a presença de outros fármacos ou a degradação da griseofulvina, sendo este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de griseofulvina no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena, até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.19 Indinavir

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 125, 250, 416 or 500 mg of indinavir sulphate equivalent to a 100, 200, 333 and 400 mg of indinavir free base, respectively. Other strengths, for example 400 mg of indinavir sulphate are known to exist. The customarily expressed dosage strengths are those of the indinavir free base content.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release indinavir tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Indinavir sulphate is extracted from tablets and capsules with water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Ethyl acetate
- 20) Methanol
- 21) Toluene
- 22) Water
- 23) Ammonia solution 25%
- 24) Secondary reference standard, for example, indinavir 125 mg tablets

6.19 Indinavir

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 125, 250, 416 ou 500 mg de sulfato de indinavir, equivalentes a 100, 200, 333 and 400 mg de indinavir na forma de base livre, respectivamente. Sabe-se que existem dosagens diferentes, por exemplo 400 mg de sulfato de indinavir. As formas de dosagem comumente expressas são as que contêm base livre de indinavir.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de indinavir de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

O indinavir é extraído de comprimidos e cápsulas com água e determinado pela CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetato de etilo
- 20) Metanol
- 21) Tolueno
- 22) Água
- 23) Solução de amoníaco a 25%
- 24) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de 125 mg de indinavir.

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, capsules containing 200 mg of indinavir. Open one capsule by carefully separating the cap from the bottom shell and transfer all the powder into a 100-ml laboratory glass bottle adding the empty capsule shells last. For extraction, suspend the powder obtained in 40 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Indinavir Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

The indinavir stock standard solution requires no further dilution. It already represents the final working concentration of 5 mg of total drug per ml. Just for more convenient handling, some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of indinavir.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 4 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 1 ml of water. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 4 mg of total drug per ml and be labelled as '*Indinavir Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of indinavir as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF INDINAVIR PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into an appropriate laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 20 ml of water using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

200 MG OF INDINAVIR PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 40 ml of water following the procedure shown above.

320 MG OF INDINAVIR PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 64 ml of water following the procedure shown above.

333 MG OF INDINAVIR PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 66.6 ml of water following the procedure shown above.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo cápsulas de 200 mg de indinavir. Abra uma cápsula, separando cuidadosamente o corpo e a cabeça e transfira todo o pó obtido para um frasco de laboratório de vidro de 100 ml, acrescentando, por último, a cápsula vazia. Para proceder à extracção, misture o pó obtido em 40 ml de água, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Indinavir*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO_A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

A solução padrão de indinavir não requer diluição adicional. Já contém a concentração final de eficácia de 5 mg de fármaco por ml. Para facilitar o manuseamento, pode transferir algum líquido sobrenadante para um frasco de 10 ml.

Esta solução padrão, com concentração limite superior de trabalho, representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de indinavir.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 4 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 1 ml de água. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 4 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Indinavir a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de indinavir, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 100 MG DE INDINAVIR POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório apropriado. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 20 ml de água, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

200 MG DE INDINAVIR POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira e extraia o pó obtido com 40 ml de água, conforme o procedimento anterior.

320 MG DE INDINAVIR POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira e extraia o pó obtido com 64 ml de água, conforme o procedimento anterior.

333 MG DE INDINAVIR POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira e extraia o pó obtido com 66,6 ml de água, conforme o procedimento anterior.

400 MG OF INDINAVIR PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 80 ml of water following the procedure shown above.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Indinavir Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Indinavir stock sample solutions require no further dilution. They already represent the final working concentration of 5 mg of total drug per ml. If prepared from a high quality product, the sample solution should match the concentration of indinavir of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 11 ml of ethyl acetate, 5 ml of methanol, 4 ml of toluene and 0.2 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

400 MG DE INDINAVIR POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira e extraia o pó obtido com 80 ml de água, conforme o procedimento anterior.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 5 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como “*Solução Stock de Amostra de Indinavir*”. Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

As soluções amostra de indinavir não requerem diluição adicional. Já contêm a concentração final de eficácia de 5 mg de fármaco por ml. Se for preparada a partir de um produto de alta qualidade, a solução de amostra deve igualar a concentração de indinavir na solução padrão de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares pode demorar algum, tempo quando utilizar soluções aquosas de amostra. Para evitar que os resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 11 ml de acetato de etilo, 5 ml de metanol, 4 ml de tolueno e 0,2 ml de solução concentrada de amoníaco, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da identidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia, após a marcação com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Indinavir's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Indinavir's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.50 indicates the presence of indinavir in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or indinavir degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all indinavir spots already observed at 254 nm are now turning orange-brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The indinavir spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior do indinavir, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior do indinavir, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,50 indica a presença de indinavir na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação do indinavir, sendo este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

Ao expor a placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de indinavir anteriormente observadas a 254 nm tornam-se agora castanho-alaranjadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de indinavir no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.20 Isoniazid (including fixed-dose combinations)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 100, 200 or 300 mg of isoniazid. Other strengths are known to exist in particular when isoniazid is presented in fixed-dose combinations with other antituberculosis medicines.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release isoniazid tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It is a major defect if a drug product does not pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Isoniazid is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with other antituberculosis drugs, all compounds can be extracted and analysed simultaneously.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Methanol
- 20) Toluene
- 21) Ammonia solution 25%
- 22) Secondary reference standard, for example, isoniazid 125 mg tablets

6.20 Isoniazida (incluindo produtos com combinações de doses fixas)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 100, 200 ou 300 mg de isoniazida. Sabe-se existir formas de dosagem de isoniazida, particularmente em combinações de doses fixas com outros medicamentos antituberculosos.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de isoniazida de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A isoniazida é extraída de comprimidos e cápsulas com metanol e determinada por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico. Quando é combinado com outros medicamentos antituberculosos, todos os compostos podem ser simultaneamente extraídos e anagraduados.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Metanol
- 20) Tolueno
- 21) Solução de amoníaco a 25%
- 22) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de 125 mg de isoniazida.

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 100 mg of isoniazid. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 20 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Isoniazid Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 2 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Isoniazid Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of isoniazid.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Isoniazid Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of isoniazid as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 60 MG OF ISONIAZID PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into an appropriate laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 12 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

75 MG OF ISONIAZID PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 15 ml of methanol following the procedure shown above.

100 MG OF ISONIAZID PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 20 ml of methanol following the procedure shown above.

150 MG OF ISONIAZID PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 30 ml of methanol following the procedure shown above.

200 MG OF ISONIAZID PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 40 ml of methanol following the procedure shown above.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 100 mg de isoniazida. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Despeje, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 20 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como «*Solução Stock do Padrão de Isoniazida*». Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 2 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Isoniazida a 100%*".

Esta solução padrão, com concentração limite superior de trabalho, representa um medicamento de alta qualidade, que contém 100% de isoniazida.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 2 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Isoniazida a 80%*".

Esta solução padrão, com concentração limite inferior, representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de isoniazida, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 60 MG DE ISONIAZIDA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório apropriado. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 12 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

75 MG DE ISONIAZIDA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira e extraia o pó obtido com 15 ml de metanol, conforme o procedimento anterior.

100 MG DE ISONIAZIDA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira e extraia o pó obtido com 20 ml de metanol, conforme o procedimento anterior.

150 MG DE ISONIAZIDA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira e extraia o pó obtido com 30 ml de metanol, conforme o procedimento anterior.

200 MG DE ISONIAZIDA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira e extraia o pó obtido com 40 ml de metanol, conforme o procedimento anterior.

300 MG OF ISONIAZID PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 60 ml of methanol following the procedure shown above.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Isoniazid Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 2 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 2 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Isoniazid Working Sample Solution*'.

The expected concentration of isoniazid in this working sample solution is 2.5 mg per ml and should match the concentration of isoniazid of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

A: 10 ml of methanol and 10 ml of toluene. Use this mobile phase for isoniazid single-dose preparations or when isoniazid is combined with rifampicin alone.

B: 12 ml of methanol, 10 ml of toluene and 0.5 ml of concentrated ammonia solution. Use this mobile phase when isoniazid is combined with ethambutol or with pyrazinamide plus rifampicin or with ethambutol, pyrazinamide plus rifampicin.

Select the mobile phase and transfer the appropriate solvents into the TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of isoniazid identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

In case ethambutol is present, stain the chromatoplate with ninhydrin for its detection. Go to page 90 to see how to perform the staining process. Note that this method of detection will make it impossible to further observe isoniazid spots under UV light of 254 nm.

300 MG DE ISONIAZIDA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira e extraia o pó obtido com 60 ml de metanol, conforme o procedimento anterior.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotuladas como “*Solução Stock de Amostra de Isoniazida*”. Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 2 ml da solução amostra, com uma pipeta, num frasco de 10 ml e adicione 2 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Isoniazida*”.

Estima-se que a concentração de isoniazida nesta solução de amostra seja de 2,5 mg por ml, devendo igualar a concentração de isoniazida na solução padrão, de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

A: 10 ml de metanol e 10 ml de tolueno. Use esta fase móvel para as preparações das doses únicas de isoniazida ou combinações de isoniazida apenas com rifampicina.

B: 12 ml de metanol, 10 ml de tolueno e 0,5 ml da solução concentrada de amoníaco. Use esta fase móvel quando a isoniazida está combinada com etambutol ou com pirazinamida e rifampicina ou com etambutol, pirazinamida e rifampicina.

Selecione a fase móvel e transfira os solventes apropriados para a câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da identidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia, após a marcação com iodo.

Para detectar a presença de etambutol, manche a placa cromatográfica com ninidrina. Consulte a página 90 para verificar como se executa este procedimento. Tenha em conta que este método de revelação tornará impossível a observação posterior de manchas de isoniazida sob luz ultravioleta de 254 nm.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM WHEN USING MOBILE PHASE A

Run No.1: Isoniazid's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Isoniazid's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Rifampicin's satellite spot

Rifampicin's principal spot

Isoniazid's principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

Mobile phase A: a blue-violet spot at a travel distance of about 0.33 indicates the presence of isoniazid in the test solution. A second spot at about 0.43 indicates the presence of rifampicin in fixed-dose combination products. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or isoniazid degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

Mobile phase B: Isoniazid travels much further the relative retention factor being about 0.45 now. When combined with pyrazinamide, a second spot will become visible at a travel distance of about 0.56. In the presence of rifampicin, a third spot can be observed at about 0.71. Go to page 163 to see the appropriate chromatoplate. Fixed-dose combinations containing ethambutol would require staining with ninhydrin solution as described earlier on page 90.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all isoniazid spots already observed at 254 nm are now turning orange-brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The isoniazid spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM USANDO A FASE MÓVEL A

1ª corrida: Concentração limite superior da isoniazida, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da isoniazida, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha secundária de rifampicina

Mancha principal de rifampicina

Mancha principal de isoniazida

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Fase móvel A: uma mancha azul-violeta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,33 indica a presença de isoniazida na solução de teste. Uma segunda mancha com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,43 indica a presença de rifampicina em incluindo produtos com combinações de doses fixas. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indiciar a presença de outros fármacos ou a degradação da isoniazida, sendo este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

Fase móvel B: As manchas de isoniazida apresentam uma distância relativa percorrida bastante maior, sendo, neste caso, o factor de retenção relativa de cerca de 0,45. Quando combinada com pirazinamida, uma segunda mancha tornar-se-á visível a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,56. Na presença de rifampicina, pode observar-se uma terceira mancha a cerca de 0,71. Veja a página 163 para verificar a placa cromatográfica apropriada. Para combinações de doses fixas que contenham etambutol é necessário proceder à marcação com solução de ninidrina, como se descreve na página 90.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

Ao expor a placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de isoniazida anteriormente observadas a 254 nm tornam-se castanho-alaranjadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas associadas a um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de isoniazida no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.21 Lamivudine (including fixed-dose combinations)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 150 mg of lamivudine. Low-dose extensions between a 30 and 100 mg of lamivudine for children and high-dose extensions with 300 mg of lamivudine for adults exist in particular when combined with other antiretrovirals. Solutions for oral administration are usually presented in strengths of 5 and 10 mg of lamivudine per ml. Frequently, lamivudine is combined with zidovudine or nevirapine plus stavudine in a single tablet or capsule formulation. Fixed-dose combinations with other antiretrovirals are known to exist.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release lamivudine tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Lamivudine solutions are diluted and tablets or capsules are extracted with water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with zidovudine, both compounds can be extracted and analysed simultaneously. When combined with nevirapine and stavudine go to page 132 and follow the procedure presented there.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

1) Pestle

2) Aluminium foil

3) Funnel

4) Label tape

5) Marker pen

6) Pencil

7) 10-ml vials

8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)

9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)

10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm

11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)

12) TLC developing chamber (500-ml jar)

13) Hot plate

14) Filter paper

15) Pair of scissors

16) Pair of tweezers

17) UV light of 254 nm

18) Iodine chamber

19) Ethyl acetate

20) Methanol

21) Toluene

22) Water

23) Secondary reference standard, for example, lamivudine 150 mg tablets

6.21 Lamivudina (incluindo produtos com combinações de doses fixas)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 150 mg de lamivudina. Existem formulações de baixa dosagem de 30 e 100 mg de lamivudina para crianças e formulações de alta-dosagem de 300 mg de lamivudina para adultos, principalmente quando combinadas com outros anti-retrovirais. As soluções para administração oral são, normalmente, apresentadas em dosagens de 5 e 10 mg de lamivudina por ml. A lamivudina é frequentemente combinada, num só comprimido ou cápsula, com zidovudina ou com nevirapina e stavudina. Sabe-se que existem combinações de dosagem fixa com outros fármacos anti-retrovirais.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de lamivudina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

As soluções de lamivudina são diluídas e os comprimidos ou cápsulas são extraídos através de água e determinadas pela CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico. Quando combinado com zidovudina, ambos os compostos podem ser extraídos e anagraduados simultaneamente. Quando estiver combinado com nevirapina e stavudina ver na página 132 o procedimento a seguir.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetato de etilo
- 20) Metanol
- 21) Tolueno
- 22) Água
- 23) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de lamivudina de 150 mg

(continuação da página 112 do texto de partida)

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 150 mg of lamivudine. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 150 mg de lamivudina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Esvazie, cuidadosamente, a folha de alumínio para

a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 30 ml of water using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Lamivudine Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Lamivudine Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of lamivudine.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Lamivudine Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of lamivudine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 30 MG OF LAMIVUDINE PER UNIT

Take two (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 12 ml of water using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 60 MG OF LAMIVUDINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 12 ml of water using a straight pipette and 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF LAMIVUDINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 20 ml of water using a straight pipette and 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 150 MG OF LAMIVUDINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 30 ml of water using a straight pipette and 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 300 MG OF LAMIVUDINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 60 ml of water using a straight pipette and 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 30 ml de água, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como «*Solução Stock do Padrão de Lamivudina*». Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,25 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Lamivudina a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior de trabalho representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de lamivudina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Lamivudina a 80%*".

Esta solução padrão, com concentração limite inferior, representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de lamivudina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AMOSTRA DE FORMAS DE DOSAGEM SÓLIDAS QUE SUPOSTAMENTE CONTÊM 30 MG DE LAMIVUDINA POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas inteiras de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de laboratório de vidro de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido das cápsulas de amostra, adicionando, por último, o revestimento. Para proceder à extracção, adicione 12 ml de água, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

FORMAS DE DOSAGEM SÓLIDAS QUE SUPOSTAMENTE CONTÊM 60 MG DE LAMIVUDINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteiros e extraia o pó obtido com 12 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

FORMAS DE DOSAGEM SÓLIDAS QUE SUPOSTAMENTE CONTÊM 100 MG DE LAMIVUDINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteiros e extraia o pó obtido com 20 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

FORMAS DE DOSAGEM SÓLIDAS QUE SUPOSTAMENTE CONTÊM 150 MG DE LAMIVUDINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteiros e extraia o pó obtido com 30 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

FORMAS DE DOSAGEM SÓLIDAS QUE SUPOSTAMENTE CONTÊM 300 MG DE LAMIVUDINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteiros e extraia o pó obtido com 60 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

LIQUID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 5 MG OF LAMIVUDINE PER ML

Solutions for oral administration coming in a concentration of 5 mg of lamivudine per ml require no further dilution and can be used directly as stock sample solution.

LIQUID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 10 MG OF LAMIVUDINE PER ML

Transfer 2 ml of the solution presented into a 10-ml laboratory glass bottle and dilute with 2 ml of water using each time appropriate straight pipettes. Close the lab bottle and shake for mixing.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Lamivudine Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Lamivudine Working Sample Solution*'.

The expected concentration of lamivudine in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of lamivudine of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 11 ml of ethyl acetate, 5 ml of methanol and 4 ml of toluene into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of drug identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

FORMAS DE DOSAGEM LÍQUIDAS QUE SUPOSTAMENTE CONTÊM 5 MG DE LAMIVUDINA POR ML

As soluções para administração oral que se apresentam numa concentração de 5 mg de lamivudina por ml não requerem diluição adicional e podem ser usadas directamente como solução amostra.

FORMAS DE DOSAGEM LÍQUIDAS DITAS CONTER 10 MG DE LAMIVUDINA POR ML

Transfira 2 ml da solução apresentada para um frasco de vidro de laboratório de 10 ml e dilua com 2 ml de água. Utilize pipetas graduadas nos dois procedimentos. Feche o frasco e agite para proceder à mistura.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 5 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como “*Solução Stock de Amostra de Lamivudine*”. Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Lamivudina*”.

Estima-se que a concentração de lamivudina nesta solução amostra de trabalho seja de 1,25 mg por ml e ela deve igualar a concentração de lamivudina na solução padrão, de combinação limite superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares pode demorar algum, tempo quando utilizar soluções aquosas de amostra. Para evitar que os resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 11 ml de acetato de etilo, 5 ml de metanol e 4 ml de tolueno, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da identidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia, após a marcação com iodo.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: A standard solution representing 100% of total lamivudine and zidovudine as upper working limit.

Run No.2: A fixed-dose combination product of good quality.

Run No.3: A fixed-dose combination product of poor quality.

Run No.4: A standard solution representing 80% of total lamivudine and zidovudine as lower working limit.

(Solvent front)

Zidovudine's principal spot

Lamivudine's principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.21 indicates the presence of lamivudine in the test solution. When combined with zidovudine, a second spot will become visible at a travel distance of about 0.61. For fixed-dose triple combinations with nevirapine and stavudine, the pattern of spots is shown on page 135. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or lamivudine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all lamivudine spots already observed at 254 nm are now turning orange-brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The lamivudine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Uma solução padrão de lamivudine e zidovudine, representando 100% do medicamento, como concentração limite superior de trabalho.

2ª corrida: Medicamento com combinação de doses fixas de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento com combinação de doses fixas de baixa qualidade.

4ª corrida: Uma solução padrão de lamivudine e zidovudine, representando 80% do medicamento, como concentração limite superior de trabalho.

(Frente do solvente)

Mancha principal de zidovudina

Mancha principal de lamivudina

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta nítida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,21 indica a presença de lamivudina na solução de teste. Quando combinada com zidovudina, uma segunda mancha tornar-se-á visível a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,61. Para combinações triplas de doses fixas com nevirapina e estavudina, o padrão das manchas está ilustrado na página 135. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação da lamivudina, sendo este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

Ao expor a placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de lamivudina anteriormente observadas a 254 nm tornam-se agora castanho-alaranjadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de lamivudina no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.22 Lumefantrine (including fixed-dose combinations)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 120 mg of lumefantrine combined with 20 mg of artemether.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release lumefantrine tablet and capsule formulations must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Lumefantrine is extracted from tablets and capsules with acetone and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with artemether, both compounds can be extracted and analysed simultaneously. For this, see also the artemether test protocol on page 52.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Acetone
- 20) Ethyl acetate
- 21) Glacial acetic acid
- 22) Toluene
- 23) Secondary reference standard, for example, lumefantrine/artemether 120/20 mg fixed-dose combination tablets

6.22 Lumefantrina (incluindo produtos com combinações de doses fixas)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 120 mg de lumefantrina combinada com 20 mg de arteméter.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de lumefantrina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A lumefantrina é extraída de comprimidos e cápsulas através de acetona e determinada por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico. Quando combinada com arteméter, ambos os compostos podem ser extraídos e anagraduados simultaneamente. Para isso, ver também o protocolo de teste do arteméter na página 52.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetona
- 20) Acetato de etilo
- 21) Ácido acético glacial
- 22) Tolueno
- 23) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de lumefantrina/arteméter de 120/20 mg com combinações de doses fixas.

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 120 mg of lumefantrine combined with 20 mg of arthemeter. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 100-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 50 ml of acetone using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 2.4 mg of total drug per ml and be labelled as '*Lumefantrine Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 2 ml of acetone. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.8 mg of total drug per ml and be labelled as '*Lumefantrine Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of lumefantrine.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 4 ml of the stock standard solution into a 25-ml vial and add 11 ml of acetone. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 0.64 mg of total drug per ml and be labelled as '*Lumefantrine Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of lumefantrine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 120 MG OF LUMEFANTRINE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 100-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 50 ml of acetone using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 2.4 mg of total drug per ml and be labelled as '*Lumefantrine Stock Sample Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 120 mg de lumefantrina combinadas com 20 mg de arteméter. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Despeje, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 100 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 50 ml de acetona com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 2,4 mg de fármaco puro por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Lumefantrina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de acetona. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 0,8 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Lumefantrina a 100%*".

Esta solução padrão, com concentração limite superior de trabalho, representa um medicamento de alta qualidade, que contém 100% de lumefantrina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 4 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 25 ml e adicione 11 ml de acetona. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 0,64 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Lumefantrina a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de lumefantrina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 120 MG DE LUMEFANTRINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de laboratório de vidro de 100 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 50 ml de acetona, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 2,4 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Lumefantrina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 2 ml of acetone. Close and shake the vial and label as '*Lumefantrine Working Sample Solution*'.

The expected concentration of lumefantrine in this working sample solution is 0.8 mg per ml and should match the concentration of lumefantrine of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 18 ml of toluene, 4 ml of ethyl acetate and 2 ml of glacial acetic acid into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes. Further verification of lumefantrine identity and content can be achieved when observing the plate at daylight after iodine staining.

In case of fixed-dose preparations with artemether, also stain the chromatoplate with sulphuric acid and heat. Go to page 54 to see how to perform the staining process. Note that this method of detection will make it impossible to further observe lumefantrine under UV light of 254 nm.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de acetona. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como "*Solução Amostra de Trabalho de Lumefantrina*".

Estima-se que a concentração de lumefantrina, nesta solução amostra de trabalho, seja de 0,8 mg por ml, devendo igualar à concentração de lumefantrina na solução padrão, de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 18 ml de tolueno, 4 ml de acetato de etilo e 2 ml de ácido acético glacial, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação. Para verificação adicional da identidade e do teor do fármaco, observe a placa à luz do dia, após a marcação com iodo.

No caso das combinações de dose fixa com arteméter, core também a placa cromatográfica com ácido sulfúrico e aqueça. Consulte a página 54 para verificar como se executa este procedimento. Tenha em conta que este método de revelação tornará impossível a observação posterior de manchas de lumefantrina sob luz ultravioleta de 254 nm.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Lumefantrine's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Lumefantrine's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Lumefantrine's principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.16 indicates the presence of lumefantrine in the test solution. No other spots should be visible even if lumefantrine is combined with artemether. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or lumefantrine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots either travelling alongside the solvent front or emerging near or even on the origin line. For the detection of arthemeter, go to page 54 and 55.

XIII. OBSERVATIONS MADE AT DAYLIGHT AFTER IODINE STAINING

When exposing the chromatoplate to iodine vapour, all lumefantrine spots already observed at 254 nm are now turning orange-brown. Still observe the plate when iodine evaporates already. Spots reflecting poor quality products will disappear first gradually followed by the reference spots representing a drug content of an 80 and 100 percent, respectively.

XIV. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The lumefantrine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior da lumefantrina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da lumefantrina, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal da lumefantrina

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta nítida, com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,16, indica a presença de lumefantrina na solução de teste. Não deve haver mais manchas visíveis, mesmo se a lumefantrina estiver combinada com arteméter. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indiciar a presença de outros fármacos ou a degradação da lumefantrina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas quer ao longo da frente do solvente quer perto da linha ou sobre esta. Veja nas páginas 54 e 55 como proceder para a detecção do arteméter.

XIII. OBSERVAÇÃO À LUZ DO DIA APÓS MARCAÇÃO COM IODO

Ao expor a placa cromatográfica ao vapor de iodo, todas as manchas de lumefantrina anteriormente observadas a 254 nm tornam-se castanho-alaranjadas. Observe a placa durante a evaporação do iodo. As manchas que denunciam um produto de fraca qualidade desaparecerão em primeiro lugar seguidas, gradualmente, pelas manchas de referência que representam uma quantidade de fármaco de 80 e 100 por cento, respectivamente.

XIV. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de lumefantrina no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.23 Mebendazole

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 100 or 500 mg of mebendazole.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release mebendazole tablets must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Mebendazole is extracted from tablets and capsules with glacial acetic acid and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) UV light of 254 nm
- 17) Ethyl acetate
- 18) Glacial acetic acid
- 19) Toluene
- 20) Secondary reference standard, for example, mebendazole 100 mg tablets

6.23 Mebendazole 120

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 100 ou 500 mg de mebendazol.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de mebendazol de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

O mebendazol é extraído de comprimidos e cápsulas através de ácido acético glacial e determinado pela CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Luz ultravioleta de 254 nm
- 17) Acetato de etilo
- 18) Ácido acético glacial
- 19) Tolueno
- 20) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de mebendazol de 100 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 100 mg of mebendazole. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 20 ml of glacial acetic acid using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Mebendazole Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 2 ml of glacial acetic acid. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Mebendazole Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of mebendazole.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 2 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of glacial acetic acid. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2 mg of total drug per ml and be labelled as '*Mebendazole Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of mebendazole as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF MEBENDAZOLE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 20 ml of glacial acetic acid using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

500 MG OF MEBENDAZOLE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 100 ml of glacial acetic acid using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Mebendazole Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 100 mg de mebendazol. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Despeje, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 20 ml de ácido acético glacial com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como «*Solução Padrão de Mebendazol*». Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 2 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de ácido acético glacial. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Mebendazol a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior de trabalho representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de mebendazol.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 2 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de ácido acético glacial. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Mebendazol a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de mebendazol, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 100 MG DE MEBENDAZOL POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de laboratório de vidro de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 20 ml de ácido acético glacial, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

500 MG DE MEBENDAZOL POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteiros e extraia o pó obtido com 100 ml de ácido acético glacial, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotuladas como "*Solução Stock de Amostra de Mebendazol*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 2 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 2 ml of glacial acetic acid. Close and shake the vial and label as '*Mebendazole Working Sample Solution*'.

The expected concentration of mebendazole in this working sample solution is 2.5 mg per ml and should match the concentration of mebendazole of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 14 ml of toluene, 4 ml of ethyl acetate and 4 ml of glacial acetic acid into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 2 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 2 ml de ácido acético glacial. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Mebendazol*”.

Estima-se que a concentração de mebendazol nesta solução de amostra seja de 2,5 mg por ml, igualando a concentração de mebendazol na solução padrão, de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 14 ml de tolueno, 4 ml de acetato de etilo e 4 ml de ácido acético glacial, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Mebendazole's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Mebendazole's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue spot at a travel distance of about 0.46 indicates the presence of mebendazole in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or mebendazole degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The mebendazole spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA COM UMA LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior do mebendazol, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior do mebendazol, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul nítida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,46 indica a presença de mebendazol na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação do mebendazol, sendo este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de mebendazol no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.24 Mefloquine

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 250 mg of mefloquine.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release mefloquine tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Mefloquine is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) UV light of 254 nm
- 17) Ethyl acetate
- 18) Methanol
- 19) Ammonia solution 25%
- 20) Secondary reference standard, for example, mefloquine 250 mg tablets

6.24 Mefloquina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 250 mg de mefloquina.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de mefloquina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, isso constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

A mefloquina é extraída de comprimidos e cápsulas com metanol e determinada por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Luz ultravioleta de 254 nm
- 17) Acetato de etilo
- 18) Metanol
- 19) Solução de amoníaco a 25%
- 20) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de 250 mg de mefloquina.

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 250 mg of mefloquine. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 40-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 25 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Mefloquine Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Mefloquine Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of mefloquine.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 2.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Mefloquine Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of mefloquine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 250 MG OF MEFLOQUINE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 40-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 25 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 10 mg of total drug per ml and be labelled as '*Mefloquine Stock Sample Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 250 mg de mefloquina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 25 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 10 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Mefloquina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Mefloquina a 100%*".

Esta solução padrão com concentração limite superior de trabalho representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de mefloquina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 2,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Mefloquina a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de mefloquina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 250 MG DE MEFLOQUINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 40 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 25 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 10 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Mefloquina*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Mefloquine Working Sample Solution*'.

The expected concentration of mefloquine in this working sample solution is 2.5 mg per ml and should match the concentration of mefloquine of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 16 ml of ethyl acetate, 4 ml of methanol and 3 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Mefloquina*”.

Estima-se que a concentração de mefloquina nesta solução de amostra seja de 2,5 mg por ml, devendo ser igual à concentração de mefloquina na solução padrão de trabalho, de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura da próxima página, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar até cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha de base. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente, isso deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 16 ml de acetato de etilo, 4 ml de metanol e 3 ml de solução concentrada de amoníaco, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque no frasco, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Mefloquine's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Mefloquine's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue spot at a travel distance of about 0.62 indicates the presence of mefloquine in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or mefloquine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The mefloquine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. Placa Cromatográfica Observada sob Luz Ultravioleta de 254 nm

1ª corrida: Concentração limite superior da mefloquina, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior da mefloquina, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul nítida, com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,62, indica a presença de mefloquina na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indiciar a presença de outros fármacos ou a degradação da mefloquina, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de mefloquina no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.25 Metronidazole

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 200, 250, 400 or 500 mg of metronidazole. Other strengths are known to exist.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release metronidazole tablets must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Metronidazole is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) UV light of 254 nm
- 17) Ethyl acetate
- 18) Methanol
- 19) Ammonia solution 25%
- 20) Secondary reference standard, for example, metronidazole 250 mg tablets

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e as formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 200, 250, 400 ou 500 mg de metronidazol. Sabe-se que existem outras dosagens.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de metronidazol de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

O metronidazol é extraído de comprimidos e cápsulas com metanol e determinado por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Luz ultravioleta de 254 nm
- 17) Acetato de etilo
- 18) Metanol
- 19) Solução de amoníaco a 25%
- 20) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de 250 mg de metronidazol.

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 250 mg of metronidazole. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 25-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 12.5 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 20 mg of total drug per ml and be labelled as '*Metronidazole Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Metronidazole Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of metronidazole.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 4 mg of total drug per ml and be labelled as '*Metronidazole Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of metronidazole as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 200 MG OF METRONIDAZOLE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

250 MG OF METRONIDAZOLE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 12.5 ml of methanol using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

400 MG OF METRONIDAZOLE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 20 ml of methanol using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 250 mg de metronidazol. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Despeje, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 12,5 ml de metanol com uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 20 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Metronidazole*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Metronidazole a 100%*".

Esta solução padrão de trabalho com concentração limite superior de trabalho representa um medicamento de alta qualidade que contém 100% de metronidazole.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 4 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Metronidazol a 80%*".

Esta solução padrão, com concentração limite inferior, representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de metronidazol, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 200 MG DE METRONIDAZOL POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

250 MG DE METRONIDAZOL POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula inteiros com 12,5 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

400 MG DE METRONIDAZOL POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 20 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

500 MG OF METRONIDAZOLE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 25 ml of methanol using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 20 mg of total drug per ml and be labelled as '*Metronidazole Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Metronidazole Working Sample Solution*'.

The expected concentration of metronidazole in this working sample solution is 5 mg per ml and should match the concentration of metronidazole of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 15 ml of ethyl acetate and 5 ml of methanol and into the jar being used as TLC developing chamber. Add 10 drops of concentrated ammonia solution, close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 20 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

500 MG DE METRONIDAZOL POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula inteira com 25 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 20 mg por ml de fármaco na forma pura e serem rotuladas como “*Solução Stock de Amostra de Metronidazol*”. Prepare estas soluções de fresco para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Metronidazole*”.

Estima-se que a concentração de metronidazol nesta solução de amostra seja de 5 mg por ml, igualando a concentração de metronidazol na solução padrão de eficácia superior, preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Podem ser colocadas cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha traçada. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. REVELAÇÃO

Transfira 15 ml de acetato de etilo e 5 ml de metanol, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Adicione 10 gotas de solução concentrada de amoníaco, feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF no frasco. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 20 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. ELUIÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Metronidazole's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Metronidazole's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Satellite spot

Principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A blue-violet spot at a travel distance of about 0.53 indicates the presence of metronidazole in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or metronidazole degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The metronidazole spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. Placa Cromatográfica Observada sob Luz Ultravioleta de 254 nm

1ª corrida: Concentração limite superior do metronidazol, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior do metronidazol, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha secundária

Mancha principal

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,53 indica a presença de metronidazol na solução de teste. Manchas nítidas adicionais formadas pela solução de teste poderiam indicar a presença de outros fármacos ou a degradação do metronidazol, estando este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de metronidazol no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.26 Neviparine

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains 200 mg of nevirapine. Low-dose extensions of 50 and 100 mg of nevirapine exist for children in particular when combined with other antiretroviral medicines in a single-tablet formulation. Liquids for oral administration are presented as suspensions usually containing 10 mg of nevirapine per ml.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release nevirapine tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Nevirapine suspensions are diluted and tablets or capsules are extracted with acidified water and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with lamivudine and stavudine, all three compounds can be extracted and analysed simultaneously.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 17) UV light of 254 nm
- 19) Ethyl acetate
- 20) Methanol
- 21) Toluene
- 22) Water
- 23) Hydrochloric acid solution 36%
- 24) Secondary reference standard, for example, nevirapine 200 mg tablets

6.26 Neviparina

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e as formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 200 mg de neviparina. Existem extensões de baixa dosagem de 50 e 100 mg de neviparine para crianças, principalmente quando combinadas com outros medicamentos anti-retrovirais num só comprimido ou cápsula. Os líquidos para administração oral apresentam-se em suspensões que contêm, normalmente, 10 mg de neviparina por ml.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de neviparina de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

As suspensões de neviparine são diluídas e os comprimidos ou cápsulas são extraídos com água acidificada e determinados pela CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico. Quando estiver combinada com lamivudina e estavudina, todos os três compostos podem ser simultaneamente extraídos e analisados.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 19) Acetato de etilo
- 20) Metanol
- 21) Tolueno
- 22) Água
- 23) Solução a 36% de ácido hidrolórico
- 24) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de 200 mg de neviparina.

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, tablets containing 200 mg of nevirapine. Wrap up one reference tablet into aluminium foil and crush it down to a fine powder using a pestle. Carefully empty the aluminium foil over a 100-ml laboratory glass bottle and wash down all residual solids with 40 ml of water using a straight pipette. Acidify with three drops of concentrated hydrochloric acid solution and verify that the pH is below three with the indicator test paper supplied. If required, add some more drops of HCl. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Nevirapine Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.25 mg of total drug per ml and be labelled as '*Nevirapine Working Standard Solution 100%*'.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of nevirapine.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 1 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 4 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 1.0 mg of total drug per ml and be labelled as '*Nevirapine Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of nevirapine as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 50 MG OF NEVIRAPINE PER UNIT

Take one whole tablet or capsule from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from a sample capsule should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 10 ml of water using a straight pipette followed by one drop of concentrated hydrochloric acid solution. Verify that the pH is below three with the indicator test paper supplied. If required, add one more drop of HCl. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 100 MG OF NEVIRAPINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 20 ml of methanol using a straight pipette and a 40-ml laboratory glass bottle as sample container. Add two drops of concentrated hydrochloric acid solution and continue to work as above. For proper extraction, ensure that the pH is below three.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo comprimidos de 200 mg de nevirapina. Embrulhe um comprimido de referência em folha de alumínio e esmague-o, até ficar num pó fino, usando o pilão. Transfira, cuidadosamente, o conteúdo da folha de alumínio para um frasco de vidro de laboratório de 100 ml e lave o resto dos resíduos sólidos com 40 ml de água, usando uma pipeta graduada. Acidifique-o com três gotas de solução de ácido hidrolórico concentrada e certifique-se que o valor de pH está abaixo de três, com o papel de teste indicador fornecido. Se for necessário adicione mais gotas de HCl. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como «*Solução Stock do Padrão de Nevirapina*». Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante, límpido ou turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,25 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Nevirapina a 100%*".

Esta solução padrão, com concentração limite superior de trabalho, representa um medicamento de alta qualidade, que contém 100% de nevirapina.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 1 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 4 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 1,0 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Nevirapina a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de nevirapina, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 50 MG DE NEVIRAPINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteira de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. No caso das cápsulas, deve transferir directamente para o frasco o pó obtido, adicionando, de seguida, o invólucro. Para proceder à extracção, adicione 10 ml de água, usando uma pipeta graduada, e em seguida uma gota de solução de ácido hidrolórico concentrada. Certifique-se que o pH está abaixo de três, com o papel indicador fornecido. Se for necessário, adicione mais uma gota de HCl. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

FORMAS DE DOSAGEM SÓLIDAS DITAS CONTER 100 MG DE NEVIRAPINA POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula inteira com 20 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 40 ml, como recipiente para amostras. Adicione duas gotas de solução de ácido hidrolórico concentrada e continue como indicado anteriormente. Para uma extracção correcta certifique-se que o pH está abaixo de três.

SOLID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 200 MG OF NEVIRAPINE PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 40 ml of water using a straight pipette and a 100-ml laboratory glass bottle as sample container. Add three drops of concentrated hydrochloric acid solution and continue to work as above. For proper extraction, ensure that the pH is below three.

LIQUID DOSAGE FORMS CLAIMING TO CONTAIN 10 MG OF NEVIRAPINE PER UNIT

Transfer 4 ml of the liquid presented into a 10-ml laboratory glass bottle and dilute with 4 ml of water using each time appropriate straight pipettes. Add one drop of concentrated hydrochloric acid solution and continue to work as above. For proper extraction, ensure that the pH is below three.

All stock sample solutions produced should finally contain 5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Neviparine Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Pipette 1 ml of the stock sample solution into a 10-ml vial and add 3 ml of methanol. Close and shake the vial and label as '*Neviparine Working Sample Solution*'.

The expected concentration of nevirapine in this working sample solution is 1.25 mg per ml and should match the concentration of nevirapine of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

Note that the filling of the microcapillary pipettes might take some time when handling aqueous sample solutions. As traces of water are causing spot tailing, completely dry off all extraction solvent before chromatoplate development using the hot plate supplied.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 11 ml of ethyl acetate, 5 ml of methanol and 4 ml of toluene into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

FORMAS DE DOSAGEM SÓLIDAS DITAS CONTER 200 MG DE NEVIRAPINA POR UNIDADE

Retire um comprimido ou uma cápsula inteiros e extraia o pó obtido com 40 ml de água, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 100 ml, como recipiente para as amostras. Adicione três gotas de solução de ácido hidrolórico concentrada e continue como indicado anteriormente. Para uma extracção correcta certifique-se que o pH está abaixo de três.

FORMAS DE DOSAGEM LÍQUIDAS DITAS CONTER 10 MG DE NEVIRAPINA POR UNIDADE

Transfira 4 ml do líquido apresentado para um frasco de vidro de laboratório de 10 ml e dilua com 4 ml de água. Utilize pipetas graduadas apropriadas nos dois procedimentos. Adicione uma gota de solução de ácido hidrolórico concentrada e continue como indicado anteriormente. Para uma extracção correcta certifique-se que o pH está abaixo de três.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 5 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como “*Solução Stock de Amostra de Neviparina*”. Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

Transfira 1 ml da solução amostra, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 3 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. Rotule-o como “*Solução Amostra de Trabalho de Neviparina*”.

Estima-se que a concentração de neviparina nesta solução de amostra de trabalho seja de 1,25 mg por ml, devendo ser igual à concentração de neviparina na solução padrão de concentração limite superior preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando os microcapilares fornecidos.

Pode-se colocar cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha traçada. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogénea à primeira tentativa.

Tenha em conta que encher os microcapilares pode demorar algum tempo, quando utilizar soluções aquosas de amostra. Para evitar que os resíduos de água originem manchas arrastadas, utilize a placa de aquecimento fornecida para secar o solvente de extracção antes da eluição da placa cromatográfica.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 11 ml de acetato de etilo, 5 ml de metanol e 4 ml de tolueno, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF no frasco. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: A standard solution representing 100% of total nevirapine, stavudine and lamivudine as upper working limit.

Run No.2: A fixed triple combination product of good quality.

Run No.3: A fixed triple combination product of poor quality.

Run No.4: A standard solution representing 80% of total nevirapine, stavudine and lamivudine as lower working limit.

(Solvent front)

Nevirapine's principal spot

Stavudine's principal spot

Lamivudine's principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue-violet spot at a travel distance of about 0.60 indicates the presence of nevirapine in the test solution. When combined with lamivudine and stavudine, a second and third spot will become visible at a travel distance of about 0.21 and 0.48, respectively. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or nevirapine degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The nevirapine spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Uma solução padrão de nevirapina, estavudina e lamivudina, representando 100% do medicamento, como limite superior de trabalho.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade com combinação de doses fixas triplas.

3ª corrida: Medicamento de baixa qualidade com combinação de doses fixas triplas.

4ª corrida: Uma solução padrão de nevirapina, estavudina e lamivudina, representando 80% do medicamento, como limite inferior de trabalho.

(Frente do solvente)

Mancha principal de nevirapina

Mancha principal de estavudina

Mancha principal de lamivudina

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul-violeta nítida com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,60 indica a presença de nevirapina na solução de teste. Quando combinada com lamivudina e estavudina, uma segunda e terceira manchas tornar-se-ão visíveis a uma distância relativa percorrida de cerca de 0,21 e 0,48, respectivamente. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indicar a presença de outros fármacos ou a degradação da nevirapina, sendo este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de nevirapina no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.27 Oseltamivir

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule for adults usually contains 98.5 mg of oseltamivir phosphate equivalent to 75 mg of oseltamivir free base. Low-dose paediatric formulations usually contain 30 or 45 mg of oseltamivir free base.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release oseltamivir tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Oseltamivir is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) UV light of 254 nm
- 17) Ethyl acetate
- 18) Methanol
- 19) Toluene
- 20) Ammonia solution 25%
- 24) Secondary reference standard, for example, oseltamivir 75 mg capsules

6.27 Oseltamivir

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e as formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 98,5 mg de fosfato de oseltamivir, equivalentes a 75 mg de oseltamivir na forma de base livre. As formulações pediátricas de baixa dosagem contêm, normalmente, 30 ou 45 mg de oseltamivir na forma de base livre.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de oseltamivir de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços invulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

O oseltamivir é extraído de comprimidos e cápsulas com metanol e determinado por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Luz ultravioleta de 254 nm
- 17) Acetato de etilo
- 18) Metanol
- 19) Tolueno
- 20) Solução de amoníaco a 25%
- 21) Padrão secundário de referência, por exemplo cápsulas oseltamivir de 75 mg

III. PREPARATION OF THE STOCK STANDARD SOLUTION

The preparation of the stock standard solution requires an authentic drug product for reference purposes, for example, capsules containing 75 mg of oseltamivir. Open one capsule by carefully separating the cap from the bottom shell and transfer all the powder into a 25-ml laboratory glass bottle adding the empty capsule shells last. For extraction, suspend the powder obtained in 10 ml of methanol using a straight pipette. Close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid. The solution obtained should contain 7.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Oseltamivir Stock Standard Solution*'. Freshly prepare this solution for each test. Continue to work with the hazy supernatant liquid.

IV. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 100% (UPPER WORKING LIMIT)

The oseltamivir stock standard solution requires no further dilution. It already represents the final working concentration of 7.5 mg of total drug per ml. Just for more convenient handling, some of the supernatant liquid may want to be transferred into a 10-ml vial.

This higher working standard solution represents a drug product of good quality containing 100 % of oseltamivir.

V. PREPARATION OF THE WORKING STANDARD SOLUTION 80% (LOWER WORKING LIMIT)

Pipette 4 ml of the stock standard solution into a 10-ml vial and add 1 ml of methanol. Close and shake the vial. The solution obtained should contain 6 mg of total drug per ml and be labelled as '*Oseltamivir Working Standard Solution 80%*'.

This lower working standard solution represents a drug product of poor quality containing just 80% of the amount of oseltamivir as stated on the product's label. In the current investigation, this drug level represents the lower acceptable limit for a given product.

VI. PREPARATION OF THE STOCK SAMPLE SOLUTION FROM A PRODUCT CLAIMING TO CONTAIN 30 MG OF OSELTAMIVIR PER UNIT

Take two (!) whole tablets or capsules from an appropriate drug product sampled in the field. As usual, tablets are wrapped up into aluminium foil and crushed down to a fine powder. Transfer all the powder obtained into a 25-ml laboratory glass bottle. Powder obtained from sample capsules should be transferred directly into the bottle adding the cap and body shells last. For extraction, add 8 ml of methanol using a straight pipette, close the bottle and shake for about three minutes until most of the solids are dissolved. Allow the solution to sit for an additional five minutes until undissolved residues settle below the supernatant liquid.

40 MG OF OSELTAMIVIR PER UNIT

Take two (!) whole tablets or capsules and extract the powder obtained with 10.7 ml of methanol using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

75 MG OF OSELTAMIVIR PER UNIT

Take one whole sample tablet or capsule and extract the powder obtained with 10 ml of methanol using a straight pipette and a 25-ml laboratory glass bottle as sample container. Continue to work as above.

All stock sample solutions produced should finally contain 7.5 mg of total drug per ml and be labelled as '*Oseltamivir Stock Sample Solution*'. Freshly prepare these solutions for each test. Continue to work with the clear or hazy supernatant liquids.

III. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DO PADRÃO

A preparação da solução stock do padrão requer um medicamento autêntico para servir de referência, por exemplo cápsulas de 75 mg de oseltamivir. Abra uma cápsula separando, cuidadosamente, as partes do revestimento e transfira todo o pó para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml adicionando, por último, o revestimento. Para proceder à extracção, misture o pó obtido em 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada. Feche o frasco e agite durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se tenha dissolvido. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco. A solução obtida deve conter 7,5 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Stock do Padrão de Oseltamivir*". Prepare uma nova solução para cada teste. Continue a trabalhar com o líquido sobrenadante turvo.

IV. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 100% (CONCENTRAÇÃO LIMITE SUPERIOR DE TRABALHO)

A solução padrão de oseltamivir não requer diluição adicional. Já contém a concentração final de trabalho de 7,5 mg de fármaco puro por ml. Para facilitar o manuseamento, pode transferir algum líquido sobrenadante para um frasco de 10 ml.

Esta solução padrão, com concentração limite superior de trabalho, representa um medicamento de alta qualidade, que contém 100% de oseltamivir.

V. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRABALHO A 80% (CONCENTRAÇÃO LIMITE INFERIOR DE TRABALHO)

Transfira 4 ml da solução padrão, com uma pipeta, para um frasco de 10 ml e adicione 1 ml de metanol. Feche o frasco e agite-o. A solução obtida deve conter 6 mg de fármaco por ml e ser rotulada como "*Solução Padrão de Trabalho de Oseltamivir a 80%*".

Esta solução padrão com concentração limite inferior representa um medicamento de fraca qualidade e contém apenas 80% de oseltamivir, como é referido no rótulo do produto. Nesta investigação, este nível de fármaco representa o limite mínimo aceitável para um dado produto.

VI. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO STOCK DE AMOSTRA DE UM PRODUTO QUE SUPOSTAMENTE CONTÉM 30 MG DE OSELTAMIVIR POR UNIDADE

Retire dois (!) comprimidos ou cápsulas inteiras de uma amostra do produto. Como anteriormente, os comprimidos devem ser embrulhados em folha de alumínio e esmagados até ficarem na forma de pó fino. Transfira todo o pó obtido para um frasco de vidro de laboratório de 25 ml. Deve transferir directamente para o frasco o pó obtido das cápsulas de amostra, adicionando, por último, o revestimento. Para proceder à extracção, adicione 8 ml de metanol, usando uma pipeta graduada, feche o frasco e agite-o durante cerca de três minutos, até que a maior parte do material sólido se dissolva. Deixe a solução repousar por mais cinco minutos, até que os resíduos não dissolvidos se depositem no fundo do frasco.

40 MG DE OSELTAMIVIR POR UNIDADE

Extraia dois (!) comprimidos ou cápsulas inteiras e extraia o pó obtido com 10,7 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

75 MG DE OSELTAMIVIR POR UNIDADE

Extraia o pó obtido da amostra de um comprimido ou de uma cápsula com 10 ml de metanol, usando uma pipeta graduada e um frasco de vidro de laboratório de 25 ml, como recipiente para amostras. Continue como indicado anteriormente.

Todas as soluções amostra preparadas devem, no final do procedimento, conter 7,5 mg de fármaco por ml e serem rotuladas como "*Solução Stock de Amostra de Oseltamivir*". Prepare novas soluções para cada teste. Continue a usar os líquidos sobrenadantes, límpidos ou turvos.

VII. PREPARATION OF THE WORKING SAMPLE SOLUTION

Oseltamivir stock sample solutions require no further dilution. They already represent the final working concentration of 7.5 mg of total drug per ml. If prepared from a high quality product, the sample solution should match the concentration of oseltamivir of the higher working standard solution produced above.

VIII. SPOTTING

Mark an origin line parallel to and about 1.5 cm from the bottom edge of the chromatoplate and apply 2 µl of each test and standard solution as shown in the picture opposite using the microcapillary pipettes supplied.

Up to five spots can be placed on a plate. Check the uniformity of all spots using UV light of 254 nm. All spots should be circular in shape and equally spaced across the origin line. Although their intensities might differ, their diameters never should. Different intensities are due to residual amounts of tablet and capsule excipients or different drug concentrations in the sample solutions. A difference in spot size, however, relates to poor spotting. Repeat this step if homogeneous spotting is not achieved first time.

IX. DEVELOPMENT

Pipette 8 ml of methanol, 6 ml of ethyl acetate, 4 ml of toluene and 2 ml of concentrated ammonia solution into the jar being used as TLC developing chamber. Close the chamber and mix thoroughly. Line the chamber's wall with filter paper and wait for about 15 minutes thus ensuring saturation of the chamber with solvent vapour. Carefully place the loaded TLC plate into the jar. Close the jar and develop the chromatoplate until the solvent front has moved about three-quarters of the length of the plate, the developing time being about 15 minutes. Remove the plate from the chamber, mark the solvent front and allow any excess solvent to evaporate using a hot plate if necessary.

X. DETECTION

Dry off all residual solvent and observe the chromatoplate under UV light of 254 nm using the battery-driven lamp supplied. Use this method of detection for both, identification and quantification purposes.

VII. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AMOSTRA DE TRABALHO

As soluções amostra de oseltamivir não requerem diluição adicional. Já contêm a concentração final de trabalho de 7,5 mg de fármaco por ml. Se for preparada a partir de um produto de alta qualidade, a solução de amostra deve ser igual à concentração de oseltamivir na solução padrão de concentração limite superior preparada anteriormente.

VIII. APLICAÇÃO DA AMOSTRA E DOS PADRÕES

Trace uma linha paralela à base da placa cromatográfica, a cerca de 1,5 cm da base, e coloque 2 µl de cada solução, de padrão e de teste, como ilustrado na figura do lado oposto, usando as pipetas com microcapilares fornecidas.

Pode-se colocar cinco manchas numa placa. Confirme a uniformidade das manchas através da luz ultravioleta de 254 nm. Todas as manchas devem ser circulares e separadas entre si por uma distância igual ao longo da linha traçada. Apesar de as suas intensidades poderem diferir, o seu diâmetro deve ser sempre igual. As diferentes intensidades ocorrem devido a quantidades residuais dos excipientes dos comprimidos ou cápsulas ou a diferentes concentrações de fármacos nas soluções de amostra. Porém, se as manchas apresentarem um tamanho diferente deve-se a uma aplicação incorrecta. Repita este passo, se não conseguir uma aplicação homogênea à primeira tentativa.

IX. ELUIÇÃO

Transfira 8 ml de metanol, 6 ml de acetato de etilo, 4 ml de tolueno e 2 ml da solução concentrada de amoníaco, com uma pipeta, para o frasco que está a ser usado como câmara de eluição de CCF. Feche a câmara e misture bem. Revista a parede da câmara com papel de filtro e aguarde cerca de 15 minutos para assegurar a saturação da câmara com o vapor do solvente. Coloque, com cuidado, a placa contendo os compostos de CCF no frasco. Feche o frasco e desenvolva a placa cromatográfica até que a frente do solvente tenha percorrido três-quartos do comprimento da placa, tendo em conta que a revelação da placa demora cerca de 15 minutos. Remova a placa da câmara, marque a frente do solvente e aguarde até que o excesso de solvente se evapore. Se for necessário, use a placa de aquecimento.

X. REVELAÇÃO

Deixe que todos os resíduos do solvente evaporem da placa cromatográfica e observe-a sob luz ultravioleta de 254 nm, usando a lanterna a pilhas fornecida. Use este método de revelação para efeitos de identificação e de quantificação.

XI. CHROMATOPLATE OBSERVED UNDER UV LIGHT OF 254 NM

Run No.1: Oseltamivir's upper working limit representing 100% of total drug.

Run No.2: A drug product of good quality.

Run No.3: A drug product of poor quality.

Run No.4: Oseltamivir's lower working limit representing 80% of total drug.

(Solvent front)

Oseltamivir's principal spot

(Origin line)

XII. OBSERVATIONS MADE AT 254 NM

A strong blue spot at a travel distance of about 0.57 indicates the presence of oseltamivir in the test solution. Additional strong spots generated by the test solution would point at other drugs or oseltamivir degradation, the latter case being more likely when associated with a smaller principal spot. Auxiliary agents incorporated in the different tablet or capsule formulations might cause some fainter spots emerging near or on the origin line.

XIII. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

The oseltamivir spot in the chromatogram obtained with the test solution must correspond in terms of colour, size, intensity, shape and travel distance to that in the chromatogram obtained with the lower and higher standard solution. This result must be obtained for each method of detection. If this is not achieved, repeat the run from scratch with a second sample. Reject the batch if the drug content cannot be verified in a third run. For a second opinion, refer additional samples to a fully-fledged drug quality control laboratory. Retain samples and put the batch on quarantine until a final decision on rejection or release has been taken.

XI. PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ ULTRAVIOLETA DE 254 NM

1ª corrida: Concentração limite superior do oseltamivir, representando 100% do medicamento.

2ª corrida: Medicamento de boa qualidade.

3ª corrida: Medicamento de fraca qualidade.

4ª corrida: Concentração limite inferior do oseltamivir, representando 80% do medicamento.

(Frente do solvente)

Mancha principal do oseltamivir

(Linha de base)

XII. OBSERVAÇÃO A 254 NM

Uma mancha azul nítida, com uma distância relativa percorrida de cerca de 0,57, indica a presença de oseltamivir na solução de teste. Manchas nítidas adicionais originadas pela solução de teste podem indiciar a presença de outros fármacos ou a degradação do oseltamivir, sendo este último caso associado a uma mancha principal mais pequena. Os agentes auxiliares incorporados nas diferentes fórmulas dos comprimidos ou cápsulas podem originar manchas mais fracas, perto da linha de base ou sobre esta.

XIII. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

A mancha de oseltamivir no cromatograma obtido através da solução de teste deve corresponder, em termos de cor, tamanho, intensidade, forma e distância relativa percorrida, às manchas do cromatograma obtidas com as soluções padrão inferior e superior. Deve obter este resultado para cada método de revelação. Se não conseguir obter este resultado, repita o teste do início com uma segunda amostra. Se não conseguir verificar o teor do fármaco num terceiro teste, rejeite o lote. Para obter uma segunda opinião, envie outras amostras para um laboratório profissional de controlo de qualidade de medicamentos. Guarde algumas amostras e coloque o lote em quarentena até que se tome uma decisão final sobre a sua rejeição ou libertação.

6.28 Paracetamol (Acetaminophen)

Primary Screening via Visual Inspection and Disintegration Test

I. VISUAL INSPECTION

Search for deficiencies on labelling, packaging and dosage forms as described in the opening chapters on general methods and operations. Write down all product particulars using the reporting form as a guide. Each tablet or capsule usually contains a 100 to 500 mg of paracetamol. Frequently, paracetamol is presented as fixed-dose combination product with aspirin, caffeine or other medicines.

II. DISINTEGRATION TEST

All quick release paracetamol tablets and capsules must pass the disintegration test as described in the opening chapters on general methods and operations. They should disintegrate in water at 37 °C in less than 30 minutes. It's a major defect if a drug product doesn't pass this test.

III. RESULTS & ACTIONS TO BE TAKEN

Drug products from unusually cheap sources, drug products with missing or incorrect accompanying documents and drug products with defective dosage forms, packaging or with incomplete, damaged or missing labels or with labels written in a foreign language should be subjected to a thin layer chromatographic test.

Verification of Drug Identity and Content via Thin Layer Chromatography

I. PRINCIPLE

Paracetamol is extracted from tablets and capsules with methanol and determined by TLC with reference to an authentic secondary standard. When combined with aspirin or caffeine, all three compounds can be extracted and analysed simultaneously.

II. EQUIPMENT AND REAGENTS

- 1) Pestle
- 2) Aluminium foil
- 3) Funnel
- 4) Label tape
- 5) Marker pen
- 6) Pencil
- 7) 10-ml vials
- 8) Set of straight pipettes (1 to 25 ml)
- 9) Set of laboratory glass bottles (25 to 100 ml)
- 10) Merck TLC aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F 254, size 5x10 cm
- 11) Glass microcapillaries (2-µl filling capacity)
- 12) TLC developing chamber (500-ml jar)
- 13) Hot plate
- 14) Filter paper
- 15) Pair of scissors
- 16) Pair of tweezers
- 17) UV light of 254 nm
- 18) Iodine chamber
- 19) Acetone
- 20) Glacial acetic acid
- 21) Methanol
- 22) Toluene
- 23) Secondary reference standard, for example, paracetamol 500 mg tablets

6.28 Paracetamol (Acetaminofeno)

Triagem Primária com Inspeção Visual e Teste de Desagregação

I. INSPECÇÃO VISUAL

Procure deficiências na rotulagem, embalagem e as formas de dosagem, tal como descrevemos nos capítulos iniciais sobre os métodos e procedimentos gerais. Registe todos os pormenores do produto, usando os formulários para relatório como orientação. Cada comprimido ou cápsula normalmente contém 100 a 500 mg de paracetamol. O paracetamol apresenta-se frequentemente como um medicamento com combinação de doses fixas com aspirina, cafeína ou outros medicamentos.

II. TESTE DE DESAGREGAÇÃO

Todos os comprimidos e cápsulas de paracetamol de libertação rápida devem passar o teste de desagregação, tal como se descreve nos capítulos iniciais sobre métodos e procedimentos gerais. Devem desagregar-se em água a 37°C em menos de 30 minutos. Se o fármaco não passar este teste, constitui um defeito importante.

III. RESULTADOS E MEDIDAS A TOMAR

Medicamentos a preços vulgarmente baixos, medicamentos com documentos de apoio em falta ou incorrectos e medicamentos com formas de dosagem irregulares, embalagens deficientes ou rótulos incompletos, danificados ou ausentes ou com rótulos escritos em língua estrangeira, devem ser submetidos a um teste cromatográfico em camada fina.

Verificação da Identidade e Conteúdo do Fármaco através do Teste Cromatográfico em Camada Fina

I. PRINCÍPIO

O paracetamol é extraído de comprimidos e cápsulas através de metanol e determinado por CCF, tendo como referência um padrão secundário autêntico. Quando associado com aspirina ou cafeína, todos os três compostos podem ser simultaneamente extraídos e analisados.

II. EQUIPAMENTO E REAGENTES

- 1) Pilão
- 2) Folha de alumínio
- 3) Funil
- 4) Fita adesiva
- 5) Marcador
- 6) Lápis
- 7) Frascos pequenos de 10 ml
- 8) Conjunto de pipetas graduadas (1 a 25 ml)
- 9) Conjunto de frascos de vidro de laboratório (25 a 100 ml)
- 10) Placas de alumínio de CCF da Merck previamente revestidas de gel de sílica 60F 254, tamanho 5x10 cm
- 11) Microcapilares de vidro (capacidade de 2 µl)
- 12) Câmara de eluição de CCF (frasco de 500 ml)
- 13) Placa de aquecimento
- 14) Papel de filtro
- 15) Tesoura
- 16) Pinças
- 17) Luz ultravioleta de 254 nm
- 18) Câmara de iodo
- 19) Acetona
- 20) Ácido acético glacial
- 21) Metanol
- 22) Tolueno
- 23) Padrão secundário de referência, por exemplo comprimidos de 500 mg de paracetamol.